

**Regulation der Signaltransduktion des PDGFb-Rezeptors
durch Transmembran-Protein-Tyrosin-Phosphatasen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biochem. Enrico Jandt,
geboren am 31.10.1974 in Ilmenau

Gutachter:

1. PD Dr. Frank Böhmer
2. Prof. Claus Liebmann
3. Prof. Peter Herrlich

Tag des Rigorosums: 06.05.2003

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.06.2003

Zusammenfassung

Eine große Bedeutung für die Signaltransduktion in Zellen kommt der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosin-Resten zu. Der Phosphorylierungszustand der Proteine in einer Zelle resultiert aus dem komplexen Zusammenspiel von Protein-Tyrosin-Kinasen, welche die Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosin-Reste katalysieren, und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP), welche diese Phosphatreste wieder entfernen. Zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören auch die Rezeptor-Isoformen für den Wachstumsfaktor PDGF (platelet-derived growth factor). Verhältnismäßig gut untersucht sind dabei die über den PDGF β -R vermittelten Funktionen von PDGF bei Proliferation, Migration, Differenzierung, der Embryonalentwicklung oder der Wundheilung. Aber auch in verschiedenen Erkrankungen und Tumoren konnten nicht physiologische Veränderungen in PDGF-vermittelten Signalwegen nachgewiesen werden. Daher besteht ein großes Interesse, die verschiedenen, durch PDGF ausgelösten Signalwege in Zellen und Geweben zu verstehen und vorallem die Möglichkeiten der negativen Regulation des PDGF β -R durch PTP sind noch weitestgehend unverstanden. Für eine Reihe von Phosphatasen konnte eine Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor nachgewiesen werden. Da für die PTP Dep-1 bereits eine Tyrosin-spezifische Dephosphorylierung des PDGF β -R gezeigt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt dieser Phosphatase auf zelluläre, PDGF-BB-stimulierte Ereignisse wie Migration und einige möglicherweise an der Migration beteiligte Signalprozesse wie die Aktivierung der MAPK-Kaskade, der PI3-Kinasen oder der Src-Kinasen untersucht werden. Daneben sollten einige ausgewählte Experimente parallel auch in PTP α - und PTP1B-exprimierenden Zellen ausgeführt und die entsprechenden Resultate verglichen werden. Da Migration und Zell-Matrix-Adhäsion eng miteinander verbunden und für PTP1B und PTP α regulatorische Rollen für die Zell-Adhäsion beschrieben sind, sollten diese Vorgänge auch für Dep-1 untersucht werden. Zum einen fanden dabei vorhandene PAE-Zelllinien mit stabiler, induzierbarer Dep-1- und PTP α -Expression sowie PTP1B k.o. Zellen mit und ohne rekonstituierte humane PTP1B Verwendung. Zum anderen wurden neue induzierbar Dep-1wt- und Dep-1C1239S-exprimierende NIH3T3-Zelllinien hergestellt. Für die katalytisch inaktive C/S-Mutante wurde ein dominant negativer Effekt auf die endogen vorhandenen Dep-1 erwartet. Mit diesen Zellmodellen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Dep-1 einen

hemmenden Einfluss auf die PDGF-stimulierte Migration in einem Boyden-Kammer-System ausübt und dass auch die Signaltransduktion des PDGF β -R negativ beeinflusst wird. Die PDGF-stimulierte Aktivität von Ras, der MAPK Erk1/Erk2, der PI3-Kinasen, von Akt und der Src-Kinase ist in Dep-1wt exprimierenden Zellen im Vergleich mit Zellen ohne Dep-1 Expression reduziert bzw. verzögert. Im Gegensatz dazu begünstigt Dep-1wt-Expression die Zell-Matrix-Adhäsion von PAE- und NIH3T3-Zellen, sowie die Adhäsions-stimulierte Aktivierung von Src. Die beobachteten Effekte von Dep-1 auf die PDGF-stimulierte Migration, die Signaltransduktion des PDGF β -R und die Zell-Matrix-Adhäsion sind offenbar von der katalytischen Aktivität der Phosphatase abhängig. Zellen mit Expression der Dep-1C/S-Mutante zeigten ein komplett gegenteiliges Verhalten in den Experimenten, was mit einer dominant negativen Funktion der Dep-1-Mutante in den NIH3T3-Zellen erklärt werden kann. So verursachte Expression von Dep-1C/S eine erhöhte Zellmigration, ein stärkeres PDGF β -R-Signaling und eine stark verzögerte Zell-Matrix-Adhäsion. Allerdings konnte auch durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren nicht eindeutig geklärt werden, welche Angriffspunkte Dep-1 in der Signaltransduktion des PDGF β -R hat. Offenbar besitzt Dep-1 neben dem PDGF-Rezeptor weitere Substrate und vorallem der Einfluss auf die Zell-Matrix-Adhäsion wird über einen PDGF-unabhängigen Weg vermittelt. Für PTP α und PTP1B konnte im Gegensatz zu Dep-1 ein fördernder Einfluss auf die PDGF-stimulierte Zellmigration gezeigt werden. Zellen mit PTP α -Expression wandern verstärkt im Boyden-Kammer-System und auch die PDGF-abhängige Aktivität von Ras und Erk1/ Erk2 ist im Vergleich mit Zellen ohne PTP α erhöht. Der positive Effekt von PTP1B auf die Migration wird anscheinend aber hauptsächlich über die Zell-Matrix-Adhäsion vermittelt und vermutlich nur geringfügig über eine Modulation der Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors. Zellen mit PTP1B-k.o. zeigten in den entsprechenden Experimenten eine stark gestörte Adhäsion und dieser Effekt beeinträchtigt auch die PDGF-stimulierte Migration.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit trotz der Beschränkungen in den Zellsystemen darauf hin, dass die Tyrosin-Phosphatasen Dep-1, PTP1B und PTP α PDGF-stimulierte Signalwege, die Zellmigration und die Zell-Matrix-Adhäsion unterschiedlich modulieren können. Das ist ein weiterer Hinweis auf die Fähigkeit von PTP, spezifisch und voneinander unterscheidbar den PDGF β -R zu regulieren.

1. Einleitung

1.1. Signaltransduktion	-4-
1.2. Tyrosinphosphorylierung	-4-
1.2.1. Tyrosin-Kinasen	-5-
<i>1.2.1.1. Zytosolische Tyrosin-Kinasen</i>	-5-
- Tyrosin-Kinasen der Src-Familie	-6-
<i>1.2.1.2. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen</i>	-6-
<i>1.2.1.3. PDGF und PDGF-Rezeptor</i>	-8-
- Struktur des PDGF	-8-
- Struktur der PDGF-Rezeptoren	-9-
- Ligandbindung und Rezeptor-Aktivierung	-9-
- Intrazelluläre Bindungspartner und Signalwege der PDGF-Rezeptoren	-10-
- Die Ras-Familie	-12-
- Erk/ MAPK-Kaskade	-13-
- Src	-14-
- PI3-Kinasen	-14-
- PLC γ	-14-
1.2.2. Protein-Tyrosin-Phosphatasen	-15-
<i>1.2.2.1. Dep-1</i>	-17-
<i>1.2.2.2. PTPα</i>	-19-
<i>1.2.2.3. PTP1B</i>	-21-
1.3. Rolle von RTK und PTP bei Zellmigration und Zell-Matrix-Adhäsion	-23-
1.3.1. Zell-Matrix-Adhäsion	-23-
1.3.2. Migration	-25-
1.4. Bedeutung von PDGF/ PDGF-Rezeptor	-27-
1.5. Negativ-Regulation des Rezeptors	-29-
1.6. Ziel der Arbeit	-30-

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien	-32-
2.2. Geräte/ Verbrauchsmaterial	-34-
2.3. DNA/ Plasmide	-35-
2.4. Zellen	-35-
2.5. Puffer	-36-
2.6. Kulturmedien	-37-
2.7. Klonierung der Dep-1-Expressionsvektoren	-38-
2.8. Zellkultur und Konstruktion der stabil Dep-1wt- und Dep-1C/S-exprimierenden NIH3T3-Zelllinien	-39-
2.9. SDS-PAGE und Immunblotting	-41-
2.10. Migrationsassay	-42-
2.11. Adhäsionsassay	-43-
2.12. Bestimmung Adhäsions-stimulierter Src-Aktivität	-44-
2.13. Bestimmung PDGF-stimulierter Src-Aktivität	-44-
2.14. Ras-Pulldown	-45-
2.15. Bestimmung der PDGF-stimulierten PI3-Kinase- Aktivität	-45-

3. Ergebnisse

3.1. Konstruktion der Dep-1wt- und Dep-1C/S-Expressions- vektoren	-47-
3.2. Erzeugung von NIH3T3-Zelllinien mit stabiler Dep-1wt- und Dep-1C/S-Expression	-51-
3.3. Proliferation unter Einfluss der PTP	-54-
3.4. Effekt der Protein-Tyrosin-Phosphatasen auf die Zell- migration	-55-
3.4.1. PDGF als chemotaktischer Lockstoff	-55-
3.4.2. Dep-1, PTP1B und PTPa haben unterschiedliche Effekte auf die PDGF-stimulierte Zellmigration	-56-

3.4.3. Einfluss der Inhibitoren D-65495, SU6656 und Wortmannin auf die PDGF-stimulierte Zellmigration	-59-
3.5. Dep-1 und PTP1B steigern die Zell-Matrix-Adhäsion ...	-61-
3.6. Einfluss der Phosphatasen auf die Signaltransduktion des PDGFb-R	-64-
3.6.1. Regulation der Ras-Aktivität	-64-
3.6.2. Regulation der Erk- und Akt- Aktivität	-66-
3.6.3. Dep-1 hemmt die PDGF-stimulierte Aktivierung von Src und der PI3-Kinasen	-68-
3.5. Dep-1 beeinflusst die Adhäsions-abhängige Aktivierung von Src	-69-

4. Diskussion

4.1 Zelllinien mit induzierbarer PTP-Expression als Modellsystem	-73-
4.2. Dep-1 als Regulator des PDGF-Rezeptors	-76-
4.3. PTP1B und PTPa im Vergleich mit Dep-1	-81-
4.4. Regulation des PDGFb-R durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen	-83-

5. Anhang

5.1. Appendix I	-87-
5.2. Abkürzungsverzeichnis	-88-
5.3. Literaturverzeichnis	-90-
5.4. Danksagung	-107-
5.5. Lebenslauf	-108-
5.6. Selbstständigkeitserklärung	-109-
5.7. Erklärung zur Bewerbung	-110-

1. Einleitung

1.1. Signaltransduktion

Für die Aufrechterhaltung normaler Funktionen und ihr Überleben ist es für alle Organismen notwendig, sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Besonders in komplexen vielzelligen Lebewesen wie z.B. dem Menschen muss dazu ein koordiniertes Zusammenspiel der einzelnen Zelltypen, Gewebe und Organe gewährleistet werden. Zu diesem Zweck existieren verschiedene Signalsysteme, welche die Kommunikation zwischen den entsprechend befähigten Komponenten und somit die Reaktion eines Partners auf den veränderten Zustand des anderen ermöglichen. Dabei lassen sich grob zwei Wege unterscheiden: zum einen können Signale und Informationen durch den Fluss elektrischer Ströme und Impulse vermittelt werden, zum anderen durch die Aussendung biochemischer Botenstoffe. Prinzipiell beinhalten diese Arten der Signalübertragung einen Sender, ein Signal, eine Empfängereinheit auf der Zielzelle und eine Signalkaskade innerhalb der Zielzelle zur Signalverarbeitung und -weiterleitung, welche dann die Antwort der Zelle auslöst. Während elektrische Signale hauptsächlich im Nervensystem eine Rolle spielen, sind die auf Botenstoffen (Peptid- und Steroidhormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Zell-Matrix-Komponenten) basierenden Signalwege stärker verbreitet, meist komplizierter und erfordern die Beteiligung einer Vielzahl sehr verschiedener Komponenten. Insgesamt codieren etwa ein Fünftel aller Gene im menschlichen Genom an Signalprozessen beteiligte Proteine.

1.2. Tyrosin-Phosphorylierung

Eine große Bedeutung für die Signaltransduktion in Zellen kommt der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosin-Resten zu, auch wenn unter physiologischen Bedingungen nur etwa 0,01% bis 0,05%, nach Stimulation oder Transformation der Zelle aber etwa 1-2% aller Phosphoproteine tyrosinphosphoryliert sind (178). Dieser Zustand resultiert aus dem komplexen Zusammenspiel von Protein-Tyrosin-Kinasen (TK), welche die Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosin-Reste katalysieren, und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP), welche diese Phosphatreste wieder entfernen. Intensive Forschung hat vor allem in den letzten Jahren gezeigt, dass die PTP dabei

1. Einleitung

nicht einfach nur die Gesamtmenge der phosphorylierten Proteine kontrollieren, sondern vielmehr selektiv auf ihre Substrate einwirken und spezifisch einzelne Signalwege modulieren können.

1.2.1. Tyrosin-Kinasen

TK lassen sich in zwei Klassen einteilen, die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und die zytosolischen Tyrosin-Kinasen (zTK) (18). Vertreter beider Klassen zählen zu den klassischen Onkoproteinen. Mutationen in den entsprechenden Genen führen häufig, zu konstitutiver oder unkontrollierter Aktivität. In der Folge werden die Zellen auch ohne Stimulus zum Wachstum oder zur Teilung angeregt, die adhäsiven Eigenschaften der Zelle geändert, was letztlich zur Transformation führen kann.

1.2.1.1. Zytosolische Tyrosin-Kinasen

Die Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen besitzen keine extrazellulären Domänen, sind aber neben ihrer zytosolischen Lokalisation häufig an Membranstrukturen assoziiert. In Abbildung 1-1 sind die zTK des Menschen schematisch dargestellt und die bekannten Onkoproteine unter ihnen besonders hervorgehoben.

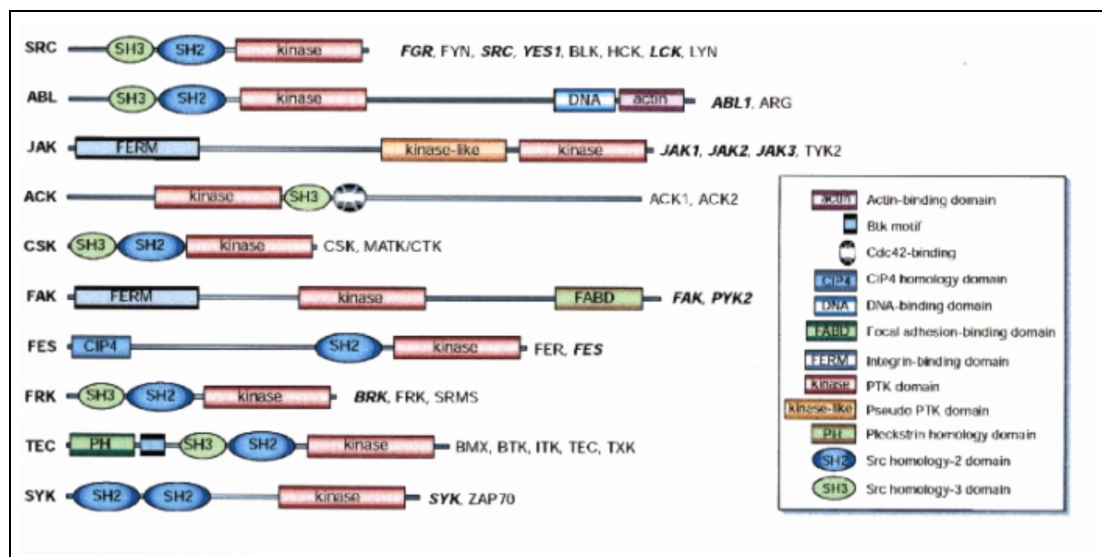


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der humanen zytosolischen Tyrosin-Kinasen nach Blume-Jensen & Hunter (18)

An der linken Seite sind die Namen der Familien, auf der rechten Seite einzelne Mitglieder der Familien angegeben. Die bekannten onkogenen Vertreter sind fett hervorgehoben.

Tyrosin-Kinasen der Src-Familie

Src war die erste bekannte Tyrosin-Kinase und ist in die Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen aber auch der Zell-Matrix-Adhäsion involviert (siehe 1.3.1.)(23, 43, 65, 96, 160, 197). Das Enzym wurde zunächst in einem Retrovirus (Rous Sarkoma Virus) entdeckt, der bei Hühnern Sarkome hervorruft. Weitere Forschung ergab, dass es sich dabei um eine onkogene (v-Src) Variante des in Säugern vorkommenden Src (c-Src) handelt, welches den Prototyp der Tyrosin-Kinasen der Src Familie (53-64 kDa) darstellt. Ein Myristinsäurerest dient Src als Membrananker, und aufgrund der Struktur der Kinase (siehe Abb. 1-2) ist die Regulation der katalytischen Aktivität ein komplexer Mechanismus.

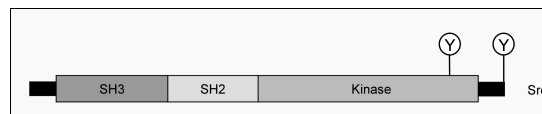


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Src-Kinase

Unter anderem ist die Src-Aktivität von der Phosphorylierung bestimmter Tyrosine abhängig. Phosphorylierung von Tyr²¹⁵ führt zu einer Aktivierung von Src und anschließender Autophosphorylierung von Tyr⁴¹⁶ in der Kinasedomäne, was die katalytische Aktivität weiter steigert (105). Andererseits verursacht Phosphorylierung des C-terminalen Tyr⁵²⁷ (in Abhängigkeit von der Spezies auch Tyr⁵²⁹) eine intramolekulare Bindung der SH2-Domäne an diese Phosphotyrosinsequenz und bewirkt damit eine autoinhibitorische Konformation von Src (198). Erst die Dephosphorylierung des negativ-regulatorischen Phospho-Tyrosins, wie sie durch RPTP α beschrieben wurde (56, 222), Bindung von Proteinen an die SH3-Domäne (siehe 1.1.2.5.) oder Bindung von anderen Liganden an die SH2-Domäne ermöglichen die Aktivierung der Kinase (206). Für c-Src wird eine Rolle als Verstärker von Signaltransduktionsprozessen, die z.B. durch Wachstumsfaktoren wie EGF ausgelöst werden, angenommen (162). Andererseits ist c-Src an der Regulation von Adhäsionsprozessen beteiligt (siehe 1.3.1.).

1.2.1.2. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Die RTK besitzen neben der intrazellulären Domäne, welche die konservierte TK-Domäne und regulatorische Sequenzen enthält, außerdem eine transmembranale Domäne und eine extrazelluläre Domäne für die Ligandenbindung. Bei Säugetieren sind

1. Einleitung

bereits über 50 verschiedene dieser Rezeptoren bekannt, die anhand ihrer Ligandenbindungsdomäne in verschiedene Subfamilien unterteilt und nach ihren natürlichen Liganden benannt werden. Abb. 1-3 zeigt eine schematische Darstellung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen des Menschen (18).

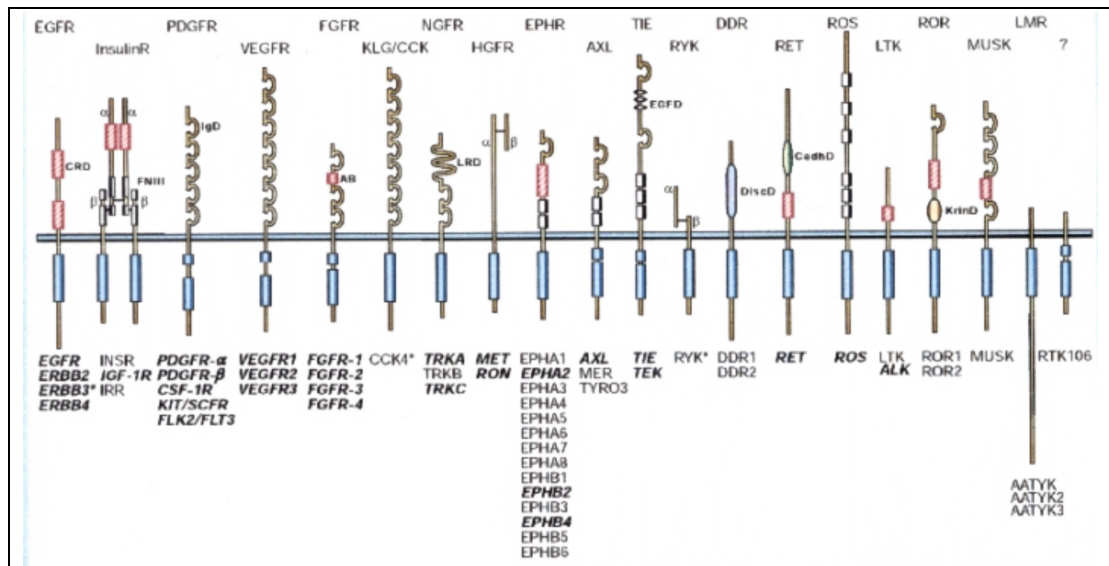


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der humanen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen nach Blume-Jensen & Hunter (18)

Über den Kinasen sind die Namen der Familien, unter den Grafiken die einzelner Mitglieder der Familien angegeben. Die bekannten onkogenen Vertreter sind fett hervorgehoben.

Die meisten Liganden der RTK sind Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (siehe 1.2.3.), EGF oder TGF α , deren Bindung zur Dimerisierung oder Oligomerisierung der RTK und damit zur Aktivierung der Rezeptoren führt. Der Ligand kann dabei selbst ein Dimer sein und so zwei Rezeptoren binden (z.B. PDGF), oder ein Monomer, welches aber trotzdem bivalent in Bezug auf die Bindung zu seinem Rezeptor ist (z.B. FGF). Eine Ausnahme ist hier die Insulin-Rezeptor-Familie, deren Mitglieder schon ohne Ligandenbindung Disulfidbrücken-verknüpfte Heterodimere bilden. Substrate der RTK sind zunächst Tyrosine in den Rezeptoren selbst. Durch Autophosphorylierung in der katalytischen Domäne wird die TK-Aktivität gesteigert, ebenso werden durch Phosphorylierung mehrerer Tyrosine außerhalb der katalytischen Domäne sequenzspezifische Bindungsstellen, an denen sich nachfolgend Signaltransduktionskomplexe aufbauen können, erzeugt. Außerdem können von den Rezeptoren weitere Substrate auch direkt phosphoryliert werden, wodurch die Aktivität der Effektoren gesteuert werden kann (173). Zur Kontrolle der RTK-Aktivität müssen Mechanismen existieren, welche die Rezeptoren wieder deaktivieren und die von ihnen ausgehenden Signale beenden oder abschwächen. Das wird durch

1. Einleitung

Dephosphorylierung der RTK, Internalisierung und Abbau und teilweise auch durch antagonistisierende Liganden erreicht (11, 24, 95, 142, 207).

1.2.1.3. PDGF und PDGF-Rezeptor

Der Platelet-driven growth factor (PDGF) gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren und wurde ursprünglich in den Blutplättchen gefunden, die ihn als Reaktion auf bestimmte Reize freisetzen. PDGF wird allerdings auch von einer ganzen Reihe anderer Zellen exprimiert. PDGF-Rezeptoren sind in vielen verschiedenen Geweben zu finden, so können z.B. Bindegewebszellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Neuronen durch PDGF stimuliert werden. Einige Zellen sind ohne PDGF nicht überlebensfähig (78).

Struktur des PDGF

PDGF ist ein Dimer aus zwei über zwei Disulfidbrücken miteinander verbundene Polypeptidketten, von denen mittlerweile vier verschiedene Isoformen, als A-, B-, C, oder D-Kette bezeichnet, bekannt sind (1, 69, 78, 114). Die Bildung von Homodimeren scheint dabei bevorzugt zu sein, da neben den Kombinationen AA, BB, CC und DD nur AB Heterodimere nachgewiesen werden konnten. Die A- und B- Ketten bestehen aus etwa 100 Aminosäuren mit acht stark konservierten Cysteinen, wobei zwei für die Disulfidbrücken zwischen den beiden Untereinheiten verwendet werden. Die beiden PDGF-Isoformen C und D weisen zwar im Vergleich mit den A- und B-Peptiden eine ähnliche Struktur auf, besitzen aber zusätzlich eine sogenannte CUB-Domäne und sind erst nach proteolytischer Abspaltung der PDGF-Domäne als Liganden biologisch aktiv. Aufgrund der Unterschiede in ihrer Konformation weisen die einzelnen Ketten auch unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber den PDGF-Rezeptor-Isoformen auf (siehe Abschnitt Ligandbindung und Rezeptoraktivierung).

1. Einleitung

Struktur der PDGF-Rezeptoren

Vom PDGF-Rezeptor existieren zwei Isoformen, die als PDGF α -R (170 kDa) und PDGF β -R (180 kDa) bezeichnet werden. Die beiden Rezeptoren gehören zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und werden zusammen mit dem MCSF-1- Rezeptor (Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor1-Rezeptor), dem Kit-Rezeptor (Stammzell-Faktor-Rezeptor) und Flt3 in einer Familie zusammen gefasst (38, 77, 78, 210). Sowohl der PDGF α -R als auch der PDGF β -R besitzt eine extrazelluläre, eine intrazelluläre und eine Transmembran-Domäne. Der zytoplasmatische Abschnitt beherbergt die charakteristische, in zwei Subdomänen unterteilte katalytische Domäne, die durch eine Insertionssequenz unterbrochen wird. In dieser befinden sich potentielle Bindungsstellen für verschiedene Effektoren, bei denen es sich in um phosphorylierbare Tyrosine handelt. Weitere Bindungsstellen konnten außerdem im C-terminalen Teil und im juxtamembranal Teil des Rezeptors identifiziert werden. Der extrazelluläre Teil besteht aus fünf Ig-ähnlichen Domänen, welche die Bindung des Liganden vermitteln. Dafür sind vor allem die drei äußersten Domänen zuständig (76, 214). Die vierte Ig artige Domäne dient der direkten Rezeptor-Rezeptor-Interaktion im Prozess der Dimerisierung.

Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Aufgrund ihrer Struktur sind die PDGF-Isoformen in der Lage zwei Rezeptormoleküle zu binden und damit eine Rezeptor-Dimerisierung auszulösen. In der dimeren Konformation kann die vorhandene basale Kinaseaktivität der RTK durch einen Trans-(Auto)phosphorylierungsmechanismus an einem Tyrosinen (Tyr⁸⁵⁷) in der katalytischen Schleife, stark erhöht werden. Nachfolgend phosphoryliert der aktivierte Rezeptor weitere intramolekulare Tyrosine, welche als Bindungsstellen für andere zu modifizierende Substrate und als Startpunkte für die verschiedenen durch PDGF ausgelösten Signaltransduktionswege (STW) dienen.

Die verschiedenen Liganden-Isoformen weisen dabei unterschiedliche Affinitäten zu den beiden Rezeptor-Isoformen auf. So binden die Ketten A und C ausschließlich an den PDGF α -R, während PDGF-D nur zum PDGF β -R eine hohe Affinität aufweist und PDGF-B assoziiert an beide Rezeptor-Isoformen gleichermaßen gut (15, 69, 120, 210). In Abhängigkeit vom gebundenen PDGF-Dimer können drei verschiedene Homo- bzw. Heterodimere aus den beiden Rezeptor-Isoformen gebildet werden ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$). Aus

1. Einleitung

den unterschiedlichen Expressionsmustern der einzelnen PDGF-Isoformen und -Rezeptoren resultieren schließlich die ähnlichen aber nicht immer gleichen Effekte der einzelnen PDGF-Liganden, bzw. die Ansprechbarkeit einzelner Gewebe auf sie (Abbildung 1-4)(77, 166, 182).

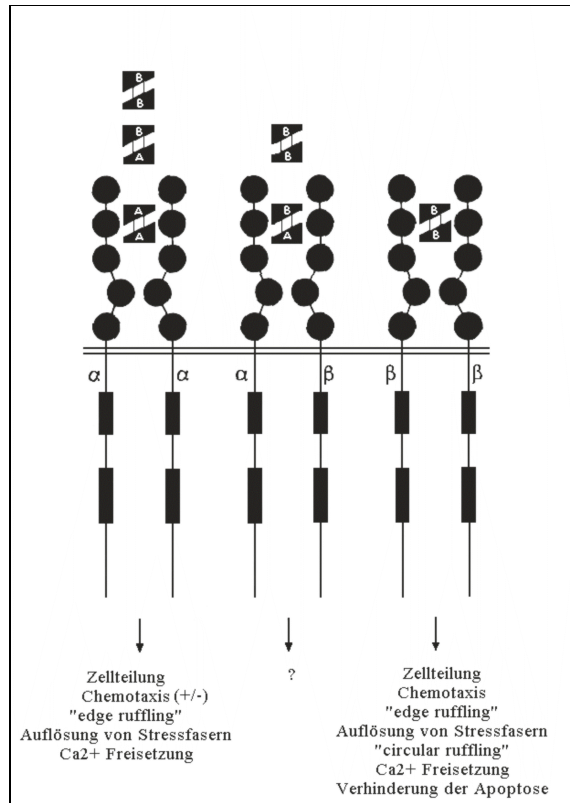


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der verschiedenen PDGF-Rezeptor-Dimere und einiger zellulärer Effekte nach Heldin, Östman & Rönstrand (77)

Intrazelluläre Bindungspartner und Signalwege des Rezeptors

Nachdem der Rezeptor wie beschrieben aktiviert und autophosphoryliert wurde, können mehrere STW in Gang gesetzt werden, die abhängig vom Typ des Rezeptordimers, dem physiologischen Zustand der Zelle, der Modulation durch andere Signalwege, der Aktivität spezieller Phosphatasen und natürlich der lokalen Verfügbarkeit der Bindungspartner und Substrate sind. Letztere assoziieren über SH2- oder PTB-Domänen an spezifische Phospho-Tyrosine des Rezeptors und besitzen entweder eine eigene, teilweise durch Tyrosin-Phosphorylierung gesteuerte katalytische Aktivität oder dienen als Adaptorproteine für andere Signalmoleküle. Tabelle 1-I und Abbildung 1-5 zeigen eine Übersicht einiger Interaktionspartner der PDGF-Rezeptoren. Nachfolgend sind verschiedene ausgewählte Effektoren und Signalwege, die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, näher beschrieben (78).

Interaktions-partner	Bindungsort im PDGF a-Rezeptor	Bindungsort im PDGF b-Rezeptor	Effekte
PI3-Kinasen	Tyr-731 Tyr-742	Tyr-740 Tyr-751	aktiviert Ser/ Thr-Kinase p70, S6-Kinase, Akt/PKB, JNK/SAPK, Mitglieder der PKC und Rho Familien
PLC- γ	Tyr-988 Tyr-1018	Tyr-1021 (Tyr-1009)	erhöht intrazellulären Ca^{2+} und Diacylglycerol Spiegel, damit u.a. Aktivierung von Mitgliedern der PKC Familie
Src	Tyr-572 (Tyr-574)	Tyr-579 (Tyr-581)	mitogenes oder motogenes Signal
SHP-2	Tyr-720 Tyr-754	Tyr-1009 (Tyr-763)	Dephosphorylierung des Rezeptors; bindet Grb2/Sos
GAP		Tyr-771	Inaktivierung von Ras
Stat5		Tyr-579 Tyr-581 Tyr-775	Transkriptionsregulation verschiedener Gene
Shc		Tyr-579 Tyr-740 Tyr-751	bindet Grb2/Sos
Grb2		Tyr-716 Tyr-775	bildet Komplex mit Sos, Aktivierung von Ras
Grb7		Tyr-716 Tyr-775	
Nck		Tyr-751	aktiviert Ser/Thr-Kinasen PAK und NIK
Crk	Tyr-702		aktiviert Nukleotid-Austauschfaktor C3G

Tabelle 1-I: Übersicht über Interaktionspartner und Signalwege der PDGF-Rezeptoren nach Heldin & Westermark (78)

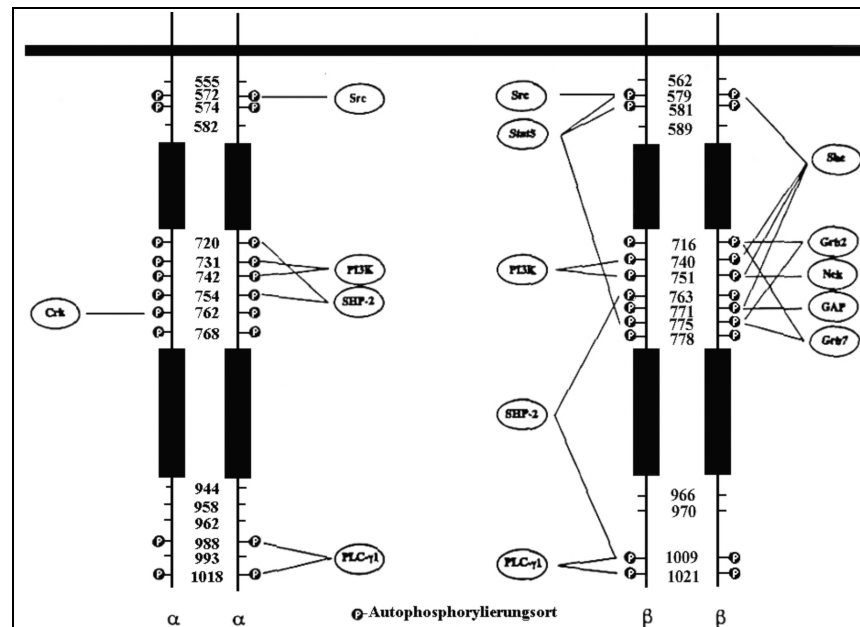


Abb. 1-5: Schematische Darstellung verschiedener Interaktionspartner der PDGF-Rezeptoren nach Heldin, Östman & Rönstrand (77) Die Bindung der aufgelisteten Proteine erfolgt über SH2-Domänen an die angegebenen Phospho-Tyrosine, nachfolgend ist Phosphorylierung der Interaktionspartner möglich. Autophosphorylierungsorte der Rezeptoren sind durch ein P markiert.

Die Ras-Familie

Die direkte oder indirekte (über Shc) Bindung des Adaptorproteins Grb2 im Komplex mit dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos ermöglicht die Aktivierung von Ras durch den PDGF-Rezeptor und damit nachfolgend die Stimulation des Erk/MAPK Weges (6). Zur Ras-Familie der monomeren GTPasen gehören die bisher bekannten Mitglieder Ha- und N-Ras sowie Ki-RasA und Ki-RasB (203). Sie sind sogenannte "kleine" GTPasen, die aus einer Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 21kDa mit intrinsischer GTPase-Aktivität bestehen (50). Die einzelnen Mitglieder der Ras-Familie zeigen in den verschiedenen Zelltypen stark variierende Expressionsmuster und binden wahrscheinlich auch an verschiedene Membrandomänen, was vermutlich Grundlage der spezifischen Funktionen einzelner Ras-Isoformen ist (60, 107). Wie alle G-Proteine existiert Ras in zwei verschiedenen Zuständen, einer GDP-gebundenen inaktiven und einer GTP-gebundenen aktiven Konformation. Nur in letztgenannter Form ist eine Signalweiterleitung möglich, und die Dauer dieses Zustandes kann durch verschiedene regulatorische Proteine modifiziert werden. So werden durch die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) p120GAP, NF1-GAP/Neurofibromin und Mitglieder der GAP1 Familien, welche die Spaltung von GTP unterstützen, die GTPasen in den inaktiven Zustand überführt. Ebenso wird der Wechsel von der GDP-Form in die GTP-Form durch

1. Einleitung

Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) wie Ras-GRP1, Ras-GRF1, CNRasGEF und Sos beschleunigt (20, 35, 58, 74, 115, 117, 144).

Ras wurde ursprünglich bei Retroviren gefunden, die bei Ratten Sarkomtumore auslösen, - daher der Name Rat Sarcoma Protein. Bei dieser Version von Ras handelt sich um eine onkogene Form des normalen Wildtyp-Ras und schon geringe Mutationen können zu einem meist konstitutiv aktiven Zustand führen. H-Ras mit der Mutation D119N weist beispielsweise eine veränderte Affinität gegenüber den Nukleotid-Substraten auf und bindet statt GTP bevorzugt XTP. Da letzteres aber im Gegensatz zu GTP nur in geringen Mengen in der Zelle vorliegt, wird D119N-H-Ras trotzdem mit GTP beladen, das aber sehr schnell wieder ohne Hydrolyse freigegeben wird (40). Während dessen ist das Ras in der Lage seine Effektoren zu aktivieren und besitzt damit einen quasi konstitutiv aktiven Zustand. Ras mit einem als V12-Mutation bezeichneten Aminosäureaustausch weist dagegen keine GTPase-Aktivität mehr auf, kann daher trotz normaler Bindung der GAP-Proteine gebundenes GTP nicht hydrolysieren und ist somit konstitutiv aktiv (66). Auch an vielen menschlichen Tumoren ist ein verändertes Mitglied der Ras-Familie beteiligt (13, 26, 111).

Aufgrund seiner Verankerung in der Zellmembran wird angenommen, dass die physiologische Funktion von Ras darin besteht, seine Effektorproteine wie RalGDS (GEF für Ral), PI3-Kinasen und vor allem Raf-1 (siehe Abschnitt Erk/MAPK Kaskade) an die Membran zu rekrutieren und dort zu aktivieren (16, 134).

ERK/ MAPK-Kaskade

Ein phylogenetisch konservierte und vom PDGF-Rezeptor stimulierter STW ist die sogenannte "MAPK"-Kaskade (Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase). Elemente dieses Weges sind die Protein-Kinasen Raf, MEK (MAPK/ Erk-Kinase) und Erk (extrazellulär regulierte Kinase). Dieser Signalweg führt nach Aktivierung des PDGFβ-R (und auch anderer RTK) über die Bindung des Adaptorproteins Grb2 im Komplex mit Sos zur Aktivierung von Ras. Die GTPase rekrutiert ihren Effektor Raf und aktiviert diesen ebenfalls. Raf fungiert in dieser Signalkette als MAPK-Kinase-Kinase und phosphoryliert die MAPK-Kinasen MEK 1 und 2 an zwei Serin-Resten, worauf diese nun in der Lage sind, die beiden MAP-Kinasen ERK 1 und 2 (p44^{MAPK} und p42^{MAPK}) durch Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung zu

1. Einleitung

stimulieren. Phosphoryliertes Erk kann dann in den Kern wandern und dort beispielsweise Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 aktivieren.

Src

Ein Beispiel für die Regulation einer enzymatischen Aktivität ist die Interaktion des PDGF-Rezeptors mit Src, das durch Bindung der eigenen SH2-Domäne an ein intramolekulares Phospho-Tyrosin (527) autoinhibiert ist (siehe Abbildung 1-2). Durch die Assoziation an den Rezeptor wird die SH2-Domäne von Tyr⁵²⁷ verdrängt und durch die Phosphorylierung weiterer Tyrosine die Kinase vollständig aktiviert. Die daraus resultierende Induktion von c-myc ist anscheinend ein wichtiger Schritt bei der Stimulation der Zellproliferation durch PDGF (12, 22). Allerdings ist die Bedeutung der Src-Kinasen für die Proliferationsregulation durch den PDGF-Rezeptor nicht unumstritten (104).

PI3-Kinasen

Eine weitere wichtige Klasse von Enzymen, die eine Vielzahl der Vorgänge in Zellen regulieren und durch den PDGF-Rezeptor aktiviert werden können, sind die PI3-Kinasen der Klasse 1a. Die Interaktion der katalytischen p110-Untereinheit der Mitglieder dieser Klasse (α , β , δ) mit den RTK erfolgt über ein Adaptorprotein, die regulatorische p85-Untereinheit. Aufgrund seiner beiden SH2-Domänen ist p85 in der Lage, an die Phospho-Tyrosine Tyr⁷⁴⁰ und Tyr⁷⁵¹ im PDGF β -R zu binden und die Aktivierung der p110-Untereinheit in einem gemeinsamen Komplex zu ermöglichen. Das bevorzugte Substrat der Klasse 1a PI3-Kinasen ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI_(4,5)P₂), welches nach seiner Umsetzung zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI_(3,4,5)P₃) Proteine wie die Ser/Thr-Kinase Akt/PKB, Mitglieder der PKC Familie, die c-Jun-Kinase oder GTPasen der Rho-Familie aktiviert. Über diesen Weg stimuliert PDGF wahrscheinlich Zellwachstum und -bewegung sowie die Apoptosehemmung (32, 180).

PLC γ

Das genannte PI_(4,5)P₂ ist auch Substrat der PhospholipaseC γ , deren Funktion ebenfalls durch direkte Assoziation an den PDGF β -Rezeptor und nachfolgende Phosphorylierung gesteuert werden kann (183). Die Produkte Diacylglycerol und IP₃

1. Einleitung

sind wichtige sekundäre Botenstoffe. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, für die Aktivität von PKC-Isoformen. Ebenso konnte die Bedeutung der PLC γ -Aktivierung für die PDGF-stimulierte Zellmigration gezeigt werden (164, 191).

1.2.2. Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Diese Enzyme werden prinzipiell als natürliche Gegenspieler der Protein-Tyrosin-Kinasen angesehen und sind deshalb ebenfalls elementare Komponenten vieler STW. Sie sind an der Kontrolle und Modulation von Zell-Zell-Interaktionen, Migration, Proliferation oder Differenzierung beteiligt (30, 554, 57, 119, 146). Bisher sind über 100 verschiedene PTP bekannt, im menschlichen Genom allein 37 verschiedene. Sie können in zwei größere und zwei kleinere Familien eingeteilt werden. Abgesehen von der katalytischen Domäne mit einem hoch konservierten Cystein, nach deren Struktur die Enzyme den Tyrosin-Phosphatasen zugeteilt werden, sowie einer beweglichen, für den Reaktionsmechanismus ebenfalls wichtigen WpD-Schleife, weisen die PTP dabei eine hohe Vielfalt in ihrem Aufbau, ihrer Regulation, Funktion und Substratspezifität auf (83, 172, 219). Einige Vertreter der beiden Hauptfamilien sind in den Abbildungen 1-6, Rezeptor-ähnliche Transmembran-PTP (RPTP), und 1-7, zytosolische PTP (zPTP), schematisch dargestellt. Die beiden kleineren Familien umfassen die LMW-PTP (low molecular weight) und die dualspezifischen PTP, die auch Serin- und Threonin-Reste dephosphorylieren können.

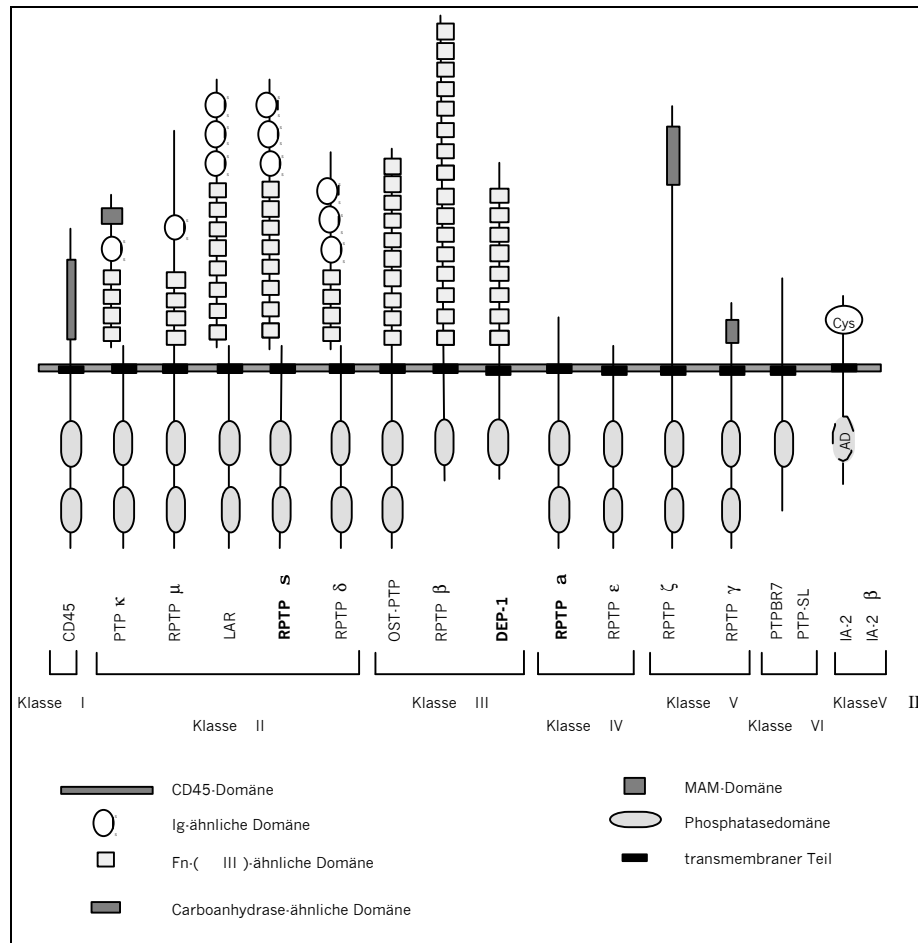


Abb. 1-6: Schematische Darstellung Rezeptor-ähnlicher Transmembran-Protein-Tyrosin-Phosphatasen nach Groß RPTP besitzen ein oder zwei intrazelluläre katalytische Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine extrazellulären Rezeptordomäne, welche die einzelnen Phosphatasen charakterisiert.

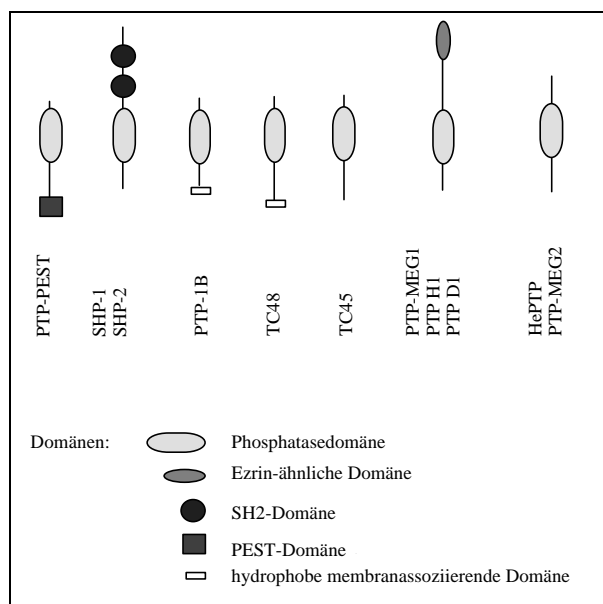


Abb. 1-7: Schematische Darstellung zytosolischer Protein-Tyrosin-Phosphatasen nach Groß Die zPTP werden auch als intrazelluläre oder nukleare PTP bezeichnet. Sie besitzen neben einer einzelnen katalytischen Domäne N- und/oder C-terminale regulatorische Domänen.

1. Einleitung

Interessanterweise sind PTP, bei denen das Cystein in der katalytischen Schleife (H/V)C(X)₅R(S/T) zu Serin mutiert ist, kaum in ihrer Struktur verändert und weiterhin in der Lage ihr Substrat zu binden. Diese katalytisch inaktiven C/S-Mutanten wirken als „Falle“ für PTP-Substrate und werden in der Literatur deshalb als „Trapping“-Mutanten bezeichnet. Mit Hilfe solcher Mutanten war es in den letzten Jahren möglich, Substrate für viele PTPs zu finden (42, 62).

1.2.2.1. *Dep-1*

Dep-1 (density enhanced phosphatase) ist eine Rezeptor-ähnliche Protein-Tyrosin-Phosphatase der Gruppe III. Sie wurde zuerst als HPTP- η bei der Charakterisierung einer Leukämie-Zelllinie identifiziert (82). Das Gen ist bei Menschen auf Chromosom 11, Region p11.2 lokalisiert und wird vor allem in Blut- und Epithelial-Zellen exprimiert, aber auch in Fibroblasten und glatten Muskelzellen (5, 49, 85, 152). Dep-1 wird auch als PTP_{rj} (Dep-1 Homolog in Mäusen), ECRTP (endothelial-cell-receptor-tyrosine-phosphatase) oder CD148 (Antigen für den mAb143-41 auf allen hämatopoietischen Zellen) bezeichnet (174). Der Name Dep resultiert aus dem Befund, dass die Expression der Phosphatase in vielen Zellen, hauptsächlich Epithelzellen, abhängig von der Zelldichte reguliert wird. Proteinmenge und katalytische Aktivität sind mit steigender Zelldichte erhöht (150). Bei r-Dep-1 in Ratten konnte Zelldichte-abhängig auch eine deutliche Steigerung der Transkription des zugehörigen Gens beobachtet werden, allerdings blieb in diesem Fall die Menge an Protein relativ konstant. Wahrscheinlich wurde die Halbwertszeit der m-RNA drastisch reduziert (19). Dep-1 kann in drei Abschnitte eingeteilt werden: Die extrazelluläre Domäne besteht aus acht Fibronectin-III artigen-Regionen (FN-III) und ist mit dem intrazellulären Teil, welcher auch die einzelne katalytische Domäne umfasst, über eine kurze Transmembran-Domäne verbunden (Abb. 1-8).



Abb. 1-8: Schematische Darstellung von Dep-1 ■ - Fibronectin-III-artige Domäne, ▨ - Membran mit Transmembran-Domäne, □ - katalytische Domäne

Das Leseraster des Gens umfasst 4011 Nukleotide. Das gesamte Protein hat 1337 Aminosäuren, wobei 940 As auf den extrazellulären und 341 As auf den intrazellulären Teil entfallen (150). Aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsmuster

1. Einleitung

variiert das Molekulargewicht zwischen 180 kDa und 225 kDa. Ein Ligand für Dep-1 konnte bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden, die katalytische Aktivität wird jedoch durch eine unbekannte Komponente der extrazellulären Matrix erhöht (184). Die FN-III-Regionen weisen außerdem ein XGD-Motiv auf, welches Ähnlichkeit mit einer für die Integrinbindung wichtigen Aminosäuresequenz in Fibronektin besitzt. Dies führte zu der Vermutung, daß Dep-1 möglicherweise als heterophiles Adhäsionsmolekül dient (81, 89). Insgesamt ist die physiologische Bedeutung von Dep-1 aber noch weitestgehend unverstanden (132). Aufgrund veränderter Expression in verschiedenen Tumoren gibt es Spekulationen, dass Dep-1 eine Rolle im durch Zellkontakt vermittelten Wachstumsstop (Kontakthemmung) und als Tumorsuppressor hat. So ist das Gen bzw. sind Allele des Gens für die Phosphatase in einigen Tumoren, u.a. Dickdarm-, Lungen, und Brust-Karzinomen, deletiert oder die Expression der PTP ist stark reduziert (63, 85, 131, 201, 218). Mäusestämme, die zwei verschiedene Allele eines als *Scc1* (Susceptibility to colon cancer) bezeichneten Genes tragen, zeigen starke Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Dickdarm-Tumoren. Während ein Stamm sehr häufig solche Tumore entwickelt, erweisen sich die Mäuse des Stammes mit dem anderen Allel als "resistent". Bei der näheren Charakterisierung von *Scc1* konnte *PTPrj* (Dep-1) als das zu Grunde liegende Gen identifiziert werden (168). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Expression von Dep-1 das Wachstum von Brustkrebs-Zellen hemmt (100). Andererseits führt die Induktion der Differenzierung von ZR75 Mammakarzinom-Zellen zu einer starken Erhöhung der Dep-1-Expression. In peripheren T-Lymphozyten konnte nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors eine gesteigerte Expression der PTP beobachtet werden (67, 194, 195). In Jurkat-Zellen hemmt Dep-1 die Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors durch Dephosphorylierung von $PLC\gamma$ und dem Adaptorprotein LAT (9). Ein wichtiger Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, daß Dep-1 den $PDGF\beta$ -R dephosphorylieren kann. Dabei besteht eine Selektivität für bestimmte Phospho-Tyrosine im $PDGF\beta$ -Rezeptor, wobei der Bindungsort für $PLC\gamma$ ein bevorzugtes Substrat ist (108, 154). Über weitere Interaktionspartner und Möglichkeiten der Regulation der Phosphatase selbst ist nur wenig bekannt. In einigen Zellen ist Dep-1 mit einer 64 kDa Protein-Ser/Thr-Kinase und verschiedenen Tyrosinkinasen assoziiert, die aber bisher nicht näher identifiziert sind (25, 89, 90).

1.2.2.2. *PTPα*

PTP α zählt ebenfalls zu den Rezeptor-ähnlichen Protein-Tyrosin-Phosphatasen und zusammen mit RPTP ϵ zur Gruppe IV. Das homologe Protein in Ratten wird auch als lrp (leucocyte common antigen-related phosphatase) bezeichnet. Zwar wurde in zahlreichen Geweben die Expression von PTP α nachgewiesen, außer einer Assoziation mit Contactin (ein extrazellulärer membrangebundener Neuronalrezeptor) konnte allerdings bisher kein Ligand identifiziert werden (98, 171). Allerdings verstärkt auch Contactin die Aktivität von PTP α nicht.

Im Gegensatz zu Dep-1 zeichnet sich PTP α durch eine kurze, nur 123 As umfassende extrazelluläre Domäne aus, die über eine 24 As lange Transmembran-Domäne mit dem aus 627 As und zwei katalytischen Domänen bestehenden intrazellulären Teil verbunden ist (Abb. 1-9) (110, 139, 147). Die unterschiedlichen Isoformen mit einem von den theoretischen 88kDa abweichenden Molekulargewicht von ca. 100 kDa und 130kDa resultieren aus zahlreichen Glykosylierungen der Serin- und Threonin-reichen extrazellulären Domäne. Die kleinere Variante ist vermutlich die nur *N*-glykosylierte Form, während die größere das zusätzlich *O*-glykosylierte Protein darstellt (47, 48, 171). Von den beiden intrazellulären katalytischen Domänen zeigt die N-terminale D1-Region den Hauptanteil der enzymatischen Aktivität gegenüber Tyrosin-phosphorylierten Substraten. Die C-terminale D2 Domäne besitzt zwar ebenfalls eine nachweisbare schwache Phosphataseaktivität, dient aber wahrscheinlich nur der Substratbindung und regulatorischen Zwecken (siehe Abb. 1-9) (56, 121, 151, 104, 212).

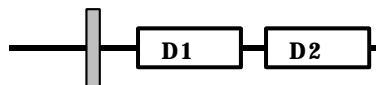




Abb. 1-9: Schematische Darstellung von PTP α  - Membran mit Transmembran-Domäne,  - katalytische Domänen D1 und D2

Eine Möglichkeit der Aktivitätsregulation von PTP α mit vielleicht genereller Bedeutung für PTP ist die Dimerisierung. Die Röntgenstruktur von PTP α zeigt, dass die N-terminalen Phosphatase-Domänen Dimere bilden können. Darin einbezogen sind beide aktive Zentren, wodurch diese blockiert werden und damit die Phosphatase negativ reguliert ist (17, 94). Möglicherweise kann durch einen ähnlichen Vorgang auch

1. Einleitung

die Aktivität von Dep-1 gehemmt werden, da der Effekt der PTP auf die Zellmigration bei Anwesenheit des anti-Der-1-Antikörpers 143.41 deutlich reduziert ist. Vermutlich verursacht hier der Antikörper die Bildung von Phosphatase-Dimeren bzw. Oligomeren (E.Jandt, Diplomarbeit).

Weiterhin kann die Aktivität von PTP α auch durch Phosphorylierung an Tyrosin- und Serin-Resten kontrolliert werden. So wird die Phosphataseaktivität stark erhöht, wenn zwei Serin-Reste (Ser¹⁸⁰ und Ser²⁰⁴) innerhalb der juxtamembranal Domäne durch die Proteinkinase C phosphoryliert wurden (200, 221, 223). Fünf Aminosäurereste vom C-Terminus entfernt befindet sich an einem Tyrosin (Tyr⁷⁸⁹) ein weiterer für die Funktion von PTP α wichtiger Phosphorylierungsort. In der Zelle sind etwa 20% der PTP α -Proteine Tyr⁷⁸⁹-phosphoryliert, was aber keinen Effekt auf die katalytische Aktivität selbst hat, sondern die Interaktion mit den zwei wichtigsten bekannten Bindungspartnern der Phosphatase, Src und Grb2, ermöglicht (55, 56, 75). Nach bisherigen Erkenntnissen ist dabei die Reaktion mit Src essentiell für die physiologische Aktivierung der Tyrosin-Kinase während Zellteilung und Adhäsion (113). So ist in PTP α k.o.-Zellen die Src-Aktivität deutlich reduziert und kann auch nur schwach durch mitogene Reize stimuliert werden. Das momentan akzeptierte Modell für die Regulation der Src Aktivität durch PTP α beinhaltet dabei einen Mechanismus, nach dem das Phosphotyrosin 789 der Phosphatase an die SH2-Domäne der Kinase bindet und dabei das autoinhibitorische Phosphotyrosin 527 von Src verdrängt, welches anschließend durch PTP α dephosphoryliert werden kann. Da Kcotransfektion der Src-Kinase und PTP α zu einer erhöhten Tyr⁷⁸⁹-Phosphorylierung führt, wird außerdem eine sich verstärkende Rückkopplungsregulation vermutet (75, 151, 187, 216, 221, 223). Als eine mögliche biologische Funktion von RPTP α ist daher ein positiv regulierender Einfluss auf die Zellproliferation wahrscheinlich. So führt z.B. die Überexpression der Phosphatase in Rattenembryo-Fibroblasten zu konstitutiver Src-Aktivierung und zellulärer Transformation (220, 224). Damit ist PTP α bisher die einzige transmembranale PTP, für die eine onkogene Wirkung nachgewiesen wurde.

Aus diesem Grund muss das Enzym auch negativ reguliert werden können, und diese Funktion wird möglicherweise durch das Adaptorprotein Grb2 übernommen, für das die Sequenz im Bereich des Tyr⁷⁸⁹ ebenfalls ein Konsensus-Bindungsort ist. Grb2 bindet mittels seiner SH2-Domäne unter der Voraussetzung an PTP α , dass das Tyr⁷⁸⁹ phosphoryliert ist. Die Grb2 Affinität ist weit höher als die der SH2-Domäne von Src

1. Einleitung

und somit verdrängt Grb2 Src aus dem PTP α -Komplex. Nach Serin-Phosphorylierung von PTP α durch die PKC ändert sich das Bindungsverhalten aber zugunsten von Src. In die Interaktion mit PTP α ist auch die SH3-Domäne von Grb2 einbezogen, und durch räumliche Behinderung ist Grb2 deshalb nicht mehr in der Lage an Sos zu binden und den Ras-Signalweg einzuleiten. Außerdem liegt das zusätzliche Bindemotiv in der Nähe des aktiven Zentrums der N-terminalen katalytischen Domäne von PTP α , so dass durch Bindung von Grb2 auch eine Hemmung der Phosphataseaktivität möglich wäre (55, 56, 186).

1.2.2.3. *PTP1B*

Bei PTP1B handelt es sich um die erste bekannte zytosolische Protein-Tyrosin-Phosphatase, die deshalb auch als Prototyp für diese Klasse von Enzymen angesehen wird. PTP1B wird in fast allen Zellen und Geweben exprimiert, darunter in den Insulin-sensitiven Organen Leber, Muskeln und Fettgewebe. Das Gen für die Phosphatase befindet sich beim Menschen auf Chromosom 20 im Locus q13.1 und ist Ausgangspunkt für zwei verschiedene Transkripte mit 3,5kB und 4,7kB, die zwei alternative Splice-Varianten darstellen. Die von diesen mRNAs synthetisierten Proteine unterliegen außerdem proteolytischen Modifikationen, so dass neben der vollständigen PTP1B mit 435 As und einem Molekulargewicht von ca. 50kDa mehrere weitere Isoformen, so auch das ursprünglich isolierte 37kDa Protein, nachgewiesen werden können (64). Das Enzym besteht aus drei Abschnitten: der katalytischen PTP-Domäne, zweier nahe dem C-terminalen Ende gelegenen Prolin-reichen Regionen, die an Interaktion mit Proteinen, die SH3-Domänen enthalten, beteiligt sind und dem sehr hydrophoben C-Terminus, der die Bindung der Phosphatase an das ER vermittelt (Abb. 1-10).



Abb. 1-10: Schematische Darstellung von PTP1B - ■ Prolin-reiche Region, □ - katalytische Domäne

Trotz der zytoplasmatischen Lokalisation gehört ein Teil der identifizierten Substrate von PTP1B zur Gruppe der Transmembran-Rezeptoren und RTK. So ist beispielsweise in PTP1B k.o. Mäusen der auffälligste Phänotyp eine erhöhte

1. Einleitung

Empfindlichkeit gegenüber Insulin und das Unvermögen der Mäuse Fettgewebe zu bilden. Dies wird teilweise auf eine erhöhte Signalaktivität des Insulin-Rezeptors zurückgeführt. (70, 177, 202). Die Signalübertragung ausgehend vom Rezeptor für Leptin, einem Hormon zur Regelung der Nahrungsaufnahme und des Energiestoffwechsels, ist in den PTP1B-k.o-Mäusen ebenfalls erhöht, was ein weiterer Grund für die "Resistenz" gegen Fettansatz ist (29, 39, 92, 99, 215). Deshalb gibt es auch intensive Bemühungen zur Herstellung spezifischer Hemmstoffe für PTP1B, da solche Substanzen mögliche Therapeutika für die Behandlung von Fettleibigkeit und Typ2-Diabetes darstellen könnten (199, 225). Auch der PDGF-Rezeptor und der EGF-Rezeptor sind Interaktionspartner von PTP1B. Mit Hilfe von Substratfallen-Mutanten konnte für PTP1B eine direkte Assoziation über das katalytische Zentrum an die aktivierten und somit phosphorylierten RTK gezeigt werden (62). PDGF- und EGF-Rezeptor sind in PTP1B k.o.-Mäusen ebenfalls hyperphosphoryliert (72). Nach erfolgter Bindung ist die Phosphatase in der Lage die Rezeptoren zu dephosphorylieren und kann auch selbst durch den EGF-Rezeptor am Tyr⁶⁶ phosphoryliert werden, was in einer erhöhten Aktivität von PTP1B resultiert (125, 141). Dies stellt möglicherweise einen selbstregulierenden Rückkopplungsmechanismus dar. Bislang weitest gehend ungeklärt war die Frage, wie PTP1B an ihre zellmembranständigen Substrate gelangt. Nach neueren Erkenntnissen erfolgt die Interaktion mit den Rezeptoren, wenn diese nach ihrer Aktivierung zum Abschalten des Signals endozytiert und in Vesikeln zum ER transportiert werden. Damit kommen die RTK in unmittelbare Nähe der Phosphatase, die daraufhin an sie binden und die weitere Inaktivierung vornehmen kann (73).

PTP1B spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion. Der Kontakt zwischen benachbarten Zellen basiert u.a. auf N-Cadherin-Proteinen in der Zellmembran, die ihre Partner auf der Nachbarzelle erkennen und binden. Die Cadherine sind über zytoplasmatisch assoziierte Catenine mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden. Die Bildung dieser Komplexe ist von der Tyrosin-Phosphorylierung abhängig. Diese wiederum kann durch die Aktivität von PTP1B reguliert werden, allerdings erst, nachdem die Phosphatase selbst an Tyr¹⁵² phosphoryliert wurde. Expression einer katalytisch inaktiven, dominant negativen PTP1B Mutante führt zum Verlust der N-Cadherin vermittelten Zell-Zell Adhäsion (4, 10, 126, 153, 159). PTP1B ist auch ein Bestandteil der fokalen Adhäsionskomplexe und

1. Einleitung

ist anscheinend für deren volle Funktionstüchtigkeit notwendig. So zeigen PTP1B-k.o.-Zellen eine gestörte Zell-Matrix-Adhäsion (28). Die Substrate von PTP1B in den Adhäsionskomplexen sind ebenfalls nicht eindeutig identifiziert. Der positive Effekt von PTP1B auf die Adhäsion wird wahrscheinlich über die Kinasen der Src-Familie vermittelt, ob über eine direkte oder indirekte Dephosphorylierung des Tyr⁵²⁷ ist aber nicht eindeutig geklärt. Über Src können durch PTP1B auch die Phosphorylierung und die Aktivität von FAK reguliert werden, ebenso von p130Cas. Das letztgenannte Protein ist auch deshalb ein möglicher Kandidat für die Vermittlung der PTP1B-abhängigen Adhäsion, da es über seine SH3-Domäne an die Prolin-reiche Region der Phosphatase binden und nachfolgend direkt dephosphoryliert werden kann. Die Folge ist eine Hemmung der von Integrinen ausgelösten Signalwege. Dagegen haben Versuche mit k.o.-Zellen gezeigt, dass die katalytische Aktivität von PTP1B notwendig für Integrin-vermittelte Signale ist. Möglicherweise ist der Mechanismus in den einzelnen Zelltypen auch unterschiedlich.

1.3. Rolle von RTK und PTP bei Zellmigration und Zell-Matrix-Adhäsion

Bewegung (Migration) und Änderung des Adhäsionsverhaltens sind zwei mögliche, eng miteinander verbundene Reaktionen von Zellen, die durch spezifische Umweltbedingungen und Stimuli ausgelöst werden können. Bei den dabei beteiligten Signalprozessen spielt Tyrosin-Phosphorylierung eine wichtige Rolle, und für eine ganze Reihe von PTP konnte eine regulatorische Funktion bei diesen beiden Vorgängen gezeigt werden (3, 226).

1.3.1. Zell-Matrix-Adhäsion

Adhärenente Zellen können nur im Verband und auf einer Unterlage (Matrix) aus hochpolymeren Glykoproteinen, beispielsweise Kollagen oder Fibronectin, und anderen Bestandteilen überleben. Die Zell-Matrix-Adhäsion wird über Rezeptorproteine vermittelt, deren Liganden in der Matrix verankert sind. Diese Rezeptoren werden als Integrine bezeichnet. Das sind glykosylierte transmembranale heterodimere Rezeptorproteine aus verschiedenen α - und β -Untereinheiten, die in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung (bisher 24 Kombinationen bekannt) Komponenten der Matrix

1. Einleitung

wie z.B. Laminine und Fibronectine spezifisch erkennen und binden, wobei die Spezifität auch durch Phosphorylierung oder proteolytische Spaltung der Integrine reguliert werden kann. Nach Assoziation mit der Matrix bilden mehrere Integrine einen sogenannten Cluster und die Grundlage für den Aufbau eines fokalen Adhäsionspunktes. Bisher sind noch nicht alle Komponenten eines solchen Komplexes bekannt, aber zumindest scheinen α -Actinin, Talin, Paxillin, Vinculin, Tensin, Src, p130Cas und FAK (Focal Adhesion Kinase) beteiligt zu sein und die Verbindung zum zellulären Zytoskelett zu vermitteln (84, 127, 211). Ausgehend von einem fokalen Adhäsionspunkt werden STW eingeleitet, die nicht nur zu Umbauten im Zytoskelett führen, sondern auch andere Prozesse wie Proteinexpression und das Überleben der Zelle steuern können. Es wird dabei von einem "Outside-Inside-Signaling" gesprochen, im Gegensatz zum "Inside-Outside-Signaling", bei dem durch Aktivierung anderer Rezeptoren Signalketten in Richtung der Integrine ausgelöst werden, die so das Adhäsionsverhalten der Zellen ändern (86, 1567, 175, 176). Dabei spielt neben der Proteinkinase C und der kleinen GTPase Rho auch die Phosphorylierung verschiedener Tyrosine eine Rolle. Vor allem die Aktivität der Kinasen Src und FAK scheint für die Funktion der fokalen Adhäsionspunkte unbedingt notwendig zu sein. In letzter Zeit gibt es auch vermehrt Hinweise darauf, dass PTP an der Kontrolle der Adhäsion durch Dephosphorylierung verschiedener Substrate innerhalb eines Adhäsionskomplexes beteiligt sind. So konnte z.B. gezeigt werden, dass PTP α durch Entfernung des Phosphates vom inhibitorischen Tyrosin 529 von Src und der daraus resultierenden Aktivierung der Kinase die Adhäsion der Zellen erhöht (65, 75). Ein ähnlicher Effekt wurde mit PTP1B beobachtet, hier sind aber vermutlich p130CAS und FAK die Substrate der Phosphatase (28). Daneben ist p130CAS auch ein Substrat der Transmembran-PTP LAR, die zusammen mit PTP δ und PTP σ die Familie der LAR-ähnlichen PTP bildet. Allerdings reguliert LAR über p130CAS anscheinend nicht die Adäsion, sondern das adhäsionsabhängige Überleben der Zelle (208). Die Dephosphorylierung von p130CAS durch LAR führt zu dessen Abbau und verhindert damit das "Outside-Inside-Signaling" ausgehend von den fokalen Adhäsionskomplexen. Die Familie der LAR-ähnlichen PTP ist aber auch an der Regulation der Adhäsion und Migration beteiligt. Aufgrund der Struktur ihrer extrazellulären Abschnitte (drei N-terminale Ig artige Abschnitte, mehrere Fibronectin-III-artige Domänen) und ihrer Expression als Dimere auf den Zelloberflächen, dienen sie möglicherweise sogar selbst

1. Einleitung

als Rezeptoren für die Zell-Matrix-Adhäsion. So weisen k.o. Mäuse für LAR und PTP σ schwere Fehlregulationen bei der Adhäsion verschiedener Zelltypen auf und sind nicht mehr in der Lage, sich von der Matrix zu lösen (3). Außerdem konnte gezeigt werden, daß Phosphatasen der LAR-Familie in Desmosomen und in fokalen Adhäsionskomplexen, assoziiert mit den Proteinen Lip-1 (LAR interacting Protein) und Trio, lokalisiert sind (156, 179). Da Trio neben einer Protein-Kinase Aktivität auch GEF-Aktivität sowohl für Rac1 als auch RhoA hat, könnte LAR über dieses Protein sogar verschiedene an Adhäsion und Migration beteiligte Signalwege beeinflussen (51). Auch die PTP SHP-1 spielt bei der Zell-Matrix-Adhäsion eine negativ regulierende Rolle. Allerdings steuert dabei SHP-1 die Adhäsion nur indirekt über die Verminderung der PI3-Kinase-Aktivität und einer daraus resultierenden verminderten Produktion von D-3-Phospholipiden (161). Zwar assoziiert SHP-1 in epithelialen Zellen zum einen an Adhäsionsproteine wie PECAM1 und C-CAM, zum anderen an p120Catenin, einem Mitglied der Familie der Catenine. Ob aber deren Funktion durch die Phosphatase moduliert wird, ist noch nicht klar (101). Außerdem wird angenommen, daß SHP-1 ebenfalls das "Outside-Inside-Signaling" in T-Zellen beeinflusst und die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors durch Integrine hemmt (137).

1.3.2. Migration

Die Migration adhärenter Zellen auf einer Matrix ist ein Vorgang, der neben dynamischen Änderungen innerhalb des Zytoskeletts auch den kontrollierten Auf- und Abbau fokaler Adhäsionspunkte voraus setzt. Für die Fortbewegung in eine bestimmte Richtung bildet die Zelle spezielle Strukturen wie Filopodien und Lamelliopodien an der Führungsseite aus und verstärkt dort die Adhäsion, während sich die Zelle an der Rückseite von der Unterlage löst. Der Aufbau von Aktinfilamenten und der Abbau von Stressfasern vermittelt schließlich die Wanderung der Zelle in die Bewegungsrichtung. Die genaue Steuerung dieser Reaktionen ist zwar noch nicht vollständig verstanden, doch einige wichtige Regulatoren sind bereits bekannt. So scheinen die Mitglieder der Rho-GTPase-Familie, RhoA, Rac1 und Cdc42, essentiell für die Migration zu sein, denn Rac1 und Cdc42 stimulieren die Formierung und bestimmen die Richtung der Filopodien und Lamelliopodien. RhoA hingegen verstärkt die Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionspunkten, was einerseits Grundlage für die Bewegung

1. Einleitung

ist, im Übermaß selbige aber verhindert. Aus diesem Grund ist eine strenge Kontrolle der RhoA-Aktivität durch GEF- und GAP-Proteine wie das p190RhoGAP notwendig. Das p190RhoGAP unterliegt dabei auch der Steuerung durch Src, und deshalb, sowie aufgrund der Regulation anderer Src-Substrate in den Adhäsionskomplexen, spielt diese Kinase für die Zellwanderung ebenfalls eine große Rolle. Auch PTP sind wegen ihrer Fähigkeit, einerseits direkt die Tyrosinphosphorylierung von Src und anderen Komponenten der Adhäsionspunkte, sowie andererseits indirekt die Aktivität verschiedener kleiner GTPasen oder der Myosin Light Chain Kinase zu verändern, potentielle Kandidaten für eine Beteiligung an der Migrationsregulation (32, 1003). Inwieweit sich die Bedeutung der Tyrosin-Phosphatasen für die sogenannte zufällige Migration, bei der die Zellen willkürlich die Richtung der Bewegung zu wechseln scheinen, von der Rolle bei der gerichteten Migration zu einem Lockstoff hin, auch als Chemotaxis bezeichnet, unterscheidet, ist nicht klar. Basis für die chemotaktische Bewegung ist außer den bereits erwähnten Vorgängen die Bindung eines Liganden wie EGF oder PDGF an seinen Rezeptor, wodurch die Zelle in Richtung des Konzentrationsgradienten polarisiert wird. Insbesondere die Vorgänge bei der PDGF-abhängigen Chemotaxis sind zwar bereits intensiv untersucht, aber noch immer ist der Mechanismus nicht vollständig verstanden (siehe Abb. 1-11) (164).

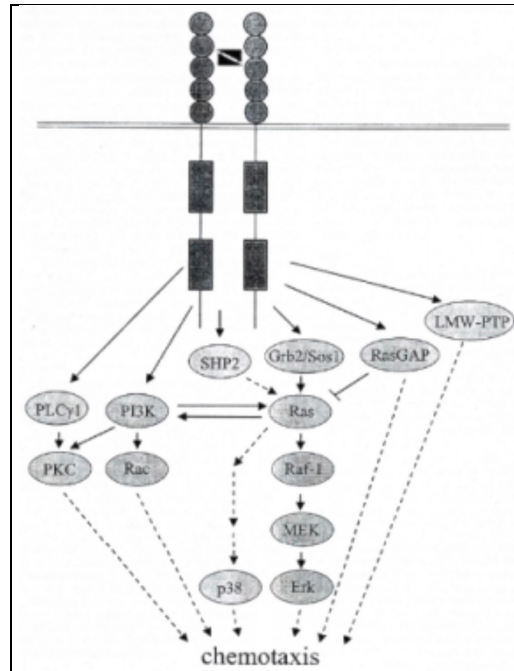


Abb. 1-11: Schematische Darstellung der Signalwege der PDGFb-R-stimulierten Chemotaxis nach Rönstrand & Heldin (164)

Dabei werden besonders zwei mögliche Signalwege als unbedingt notwendig diskutiert, PI3-Kinasen und PLC γ (165, 183, 191). Allerdings scheint es von Zelltyp und Stimulus abhängig zu sein, ob die Signale vorrangig über einen, beide oder einen der anderen möglichen Wege vermittelt werden. Hieraus ergibt sich eine Möglichkeit für PTPs in die Chemotaxis einzugreifen, da zumindest für einige wenige gezeigt werden konnte, daß sie spezifisch diese Signalwege modulieren können.

1.4. Bedeutung von PDGF/PDGF-Rezeptor

Besonders gut untersucht sind die über den PDGFβ-R vermittelten Funktionen des PDGF. Auf Zellebene stimuliert PDGF wirkungsvoll Proliferation und Migration, reguliert Differenzierung, Stoffwechsel, den Transport von Hexose-monophosphat und die Apoptose. Die Reaktionen nach Stimulierung des PDGFα-R sind meist ähnlich, abhängig vom Zelltyp kann es aber auch zu gegenteiligen Effekten kommen (213). So führt z.B. die Aktivierung des PDGFβ-R zu einer starken chemotaktischen Migration vaskulärer glatter Muskelzellen, aber die Aktivierung des PDGFα-R hemmt diese (109). PDGF spielt während der Embryonalentwicklung eine große Rolle. Aus Versuchen mit k.o.-Mäusen ist bekannt, dass eine Inaktivierung der B-Kette oder des β-Rezeptors

1. Einleitung

schwere Störungen in den Nieren und bei der Bildung der Blutgefäße verursacht. Diese Mäuse sterben meist bei der Geburt (116, 122, 123, 185). Etwa drei Wochen leben Mäuse mit einem k.o. der A-Kette, welcher schwere Fehlbildungen in der Lunge zur Folge hat (21). Im erwachsenen Organismus ist PDGF essentiell für die Blutplättchenaggregation, Wundheilung und die Erhaltung des Druckes der Zwischenzellflüssigkeit (interstitial fluid pressure) und scheint einen Einfluss auf die Integrin vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion zu haben (77, 80, 155, 163). Des weiteren ist der Wachstumsfaktor an der Blutdruckregulation beteiligt, wobei eine Erhöhung des Blutdruckes durch sich verengende Gefäße ebenso möglich ist, wie eine Senkung des Druckes durch sich erweiternde Gefäße. Letzteres wird vermutlich über einen Weg unter Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt (45, 169, 170).

Es wird heute immer mehr deutlich, dass viele Erkrankungen und vor allem eine große Zahl von Tumoren mit nicht physiologischen Veränderungen in PDGF-vermittelten Signalwegen verbunden sind. So konnte gezeigt werden, dass eine unkontrollierte Ausschüttung von PDGF, welches dann als auto- bzw. parakrines Mitogen wirkt, bei einigen malignen Erkrankungen wie Gliomen, Glioblastomen, Dickdarm- und Mammakarzinomen beteiligt ist (79, 124, 180, 188). Eine erhöhte Expression der erst kürzlich entdeckten PDGF-Formen C und D konnte in Ewing Sarkomen und in Glioblastomen nachgewiesen werden, hingegen kaum in gesundem Gehirngewebe (129, 227, 228). Unklar ist in den meisten Fällen allerdings die Frage, ob die autokrine Stimulation der Zellteilung Ursache oder fördernde Begleiterscheinung bei der Tumorentwicklung ist. Sehr viel besser verstanden ist dagegen die Rolle des PDGF- β -R bei der als Restenose bezeichneten Wiederverschließung der Koronar-Arterien nach einer Ballon-Angioplastie (68). So konnte in Tiermodellen gezeigt werden, daß nach Verletzung der Gefäßwand vermehrt PDGF ausgeschüttet und die Expression des Rezeptors erhöht wird, was zu einer verstärkten Teilung der glatten Muskelzellen sowie Bildung der Neointima führt. Durch Hemmung oder Neutralisation des PDGF β -R durch spezifische Inhibitoren oder Antikörper konnten die genannten Prozesse deutlich verringert werden (52, 93, 102, 128, 138). Auch in Geweben, die Ort chronischer Entzündungen oder Fibrosierung sind (z.B. bei Arteriosklerose, glomerulärer Nephritis), konnten verstärkt verschiedene PDGF-Isoformen und der PDGF β -R nachgewiesen werden. Ob der Wachstumsfaktor dabei die krankhaften

Veränderungen nur auslöst oder sich auch für den chronischen Verlauf verantwortlich zeigt, ist weiterhin spekulativ (46, 133, 157).

1.5. Negativ-Regulation des PDGF-Rezeptors

Die Aktivierung der PDGF-Rezeptoren ist heute vergleichsweise sehr gut untersucht und verstanden. Unter physiologischen Bedingungen ist es aber ebenfalls notwendig, daß die Rezeptoren wieder abgeschaltet und die von ihnen ausgehenden Signale beendet werden. Die entsprechenden Vorgänge sind Gegenstand intensiver Forschung, und neben einer geringeren Expression durch Reduktion von Transkription und Translation der Rezeptor-Gene werden hauptsächlich zwei weitere Möglichkeiten für die Inaktivierung der RTK diskutiert (78): So wird der PDGF-Rezeptor nach Bindung seines Liganden sehr schnell durch Internalisierung in speziellen Clathrin-bedeckten Vesikeln von der Zelloberfläche entfernt. Dieser aktive Prozess, unter Beteiligung von Dynamin, ist abhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors, und sowohl Src- als auch PI3-Kinasen scheinen dafür notwendig zu sein. Nach der Internalisierung kann der PDGF-Rezeptor entweder zur Oberfläche zurück gebracht oder nach Ubiquitinierung abgebaut werden. Die genaue Steuerung ist allerdings noch weitestgehend unklar.

Die zweite Möglichkeit der Inaktivierung umfasst die Dephosphorylierung des PDGF-Rezeptors durch PTP (33, 149). Dies ermöglicht nicht nur die rasche und vollständige Abschaltung der RTK, sondern potentiell auch die spezifische Modulation einzelner Signalwege. Beispielsweise kann über die Dephosphorylierung bestimmter Reste in der Juxtamembran-Domäne (88) oder des Tyr⁸⁵⁷ in der Aktivierungsschleife des PDGFβ-R die Gesamtaktivität der Kinase reduziert werden, während bei Phospho-Tyrosinen, die als Bindestellen für nachfolgende Signalmoleküle dienen, nur der entsprechende Signalweg betroffen wäre und andere Funktionen des Rezeptors unbeeinflusst bleiben würden. Mittlerweile konnten eine Reihe von Phosphatasen identifiziert werden, die mit dem PDGF-Rezeptor interagieren.

PTP kontrollieren offenbar nicht nur die Abschaltung von RTK sondern auch deren Basalaktivität in Abwesenheit von Liganden. So konnte für verschiedene RTK nach Behandlung entsprechender Zellen mit UV-Strahlung, Vanadat oder Oxidantien wie H₂O₂ eine erhöhte Phosphorylierung gezeigt werden, die unabhängig von einem

1. Einleitung

vorhandenen Liganden ist. Verursacht wird diese Hyperphosphorylierung durch eine reduzierte Dephosphorylierung der basal aktiven Rezeptoren durch assoziierte PTP, die durch die genannten Behandlungen gehemmt werden (44, 71, 97, 106, 190). Die Ausschaltung der Phosphatase-vermittelten Negativregulation des PDGF-Rezeptors kann anscheinend auch durch den Rezeptor selbst, nach seiner Aktivierung durch PDGF, ausgelöst werden. Eine der dabei identifizierten PTP ist SHP-2 (140). Über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Signalweg stimuliert PDGF eine rasche Produktion von H_2O_2 , welches dann vermutlich die PTP durch Oxidation des Cysteins in ihrem katalytischen Zentrum hemmt. Es gibt einige Hinweise darauf, dass für diesen reversiblen Prozess der PI3-Kinase-Signalweg unter Beteiligung von Rac1 und der NADPH-Oxidase notwendig ist (7).

Der PDGF β -R kann also durch verschiedene PTP reguliert werden und vermag offenbar auch die Aktivität der Phosphatasen zu steuern. Bisher konnte für Dep-1, SHP-1, SHP-2, PTP α , LMW, PTP1B, PTP-Pest und die T-Zell-Phosphatase *in vitro* und teilweise ebenfalls *in vivo* eine Interaktion mit dem PDGF β -Rezeptor gezeigt werden (siehe 4.4.)(31, 71, Markova, eingereicht 2002). Dep-1 dephosphoryliert in Abhängigkeit von der umgebenden Sequenz sogar spezifisch einzelne Phospho-Tyrosine des Rezeptors und moduliert wahrscheinlich die Signalübertragung über PLC γ und die PI3-Kinasen (108, 154). Auch SHP-1, SHP-2 und LMW üben im wesentlichen einen inhibitorischen Einfluss auf das PDGF-Signaling aus, aber z.B. die Lokalisierung der LMW und die Aktivität gegenüber anderen Substraten wird durch PDGF-stimulierte Phosphorylierung an Tyr¹³¹ und Tyr¹³² beeinflusst (32, 34, 61). Die genaue Rolle einzelner PTP für die Signalwege des PDGF-Rezeptors ist aber noch weitestgehend unbekannt.

1.6. Ziel der Arbeit

Aufgrund der beschriebenen sowohl physiologischen als auch pathologischen Rolle der PDGF-Isoformen und ihrer Rezeptoren besteht ein großes Interesse, die verschiedenen, durch PDGF ausgelösten Signalwege in Zellen und Geweben zu verstehen. Zu diesem Zweck müssen allerdings die molekularen Mechanismen im PDGF-Rezeptor-Signaling und die beteiligten Komponenten genau charakterisiert sein, was z.Z. noch nicht der Fall ist. Besonders die Bedeutung der PTP ist noch

1. Einleitung

weitestgehend unklar. Da für die PTP Dep-1 bereits eine Tyrosin-spezifische Dephosphorylierung des PDGF β -R gezeigt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt dieser Phosphatase auf zelluläre, PDGF-BB-stimulierte Ereignisse wie Migration und einige möglicherweise an der Migration beteiligte Signalprozesse wie die Aktivierung der MAPK-Kaskade, der PI3-Kinasen, der PLC γ oder der Src-Kinasen untersucht werden. Um einen Einblick in den generellen Einfluss von PTP auf die STW des PDGF β -R zu bekommen, sollten ähnliche Experimente parallel auch in PTP α - und PTP1B-exprimierenden Zellen ausgeführt und die entsprechenden Resultate verglichen werden. Da Migration und Zell-Matrix-Adhäsion eng miteinander verbunden und für PTP1B und PTP α regulatorische Rollen für die Zell-Adhäsion beschrieben sind, sollte herausgefunden werden, ob auch Dep-1 diese Vorgänge beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden bereits vorhandene Zelllinien mit stabiler, induzierbarer Dep-1- und PTP α -Expression sowie PTP1B k.o. Zellen mit und ohne rekonstituierte humane PTP1B verwendet. Außerdem sollten neue konditionell Dep-1wt und Dep-1C1239S exprimierende Zelllinien hergestellt und analysiert werden. Es wurde erwartet, dass die Dep-1-C1239S-Mutante einen dominant negativen Effekt auf durch endogene Dep-1 beeinflusste Prozesse hat. Dadurch sollten die durch Dep-1wt Überexpression erhaltenen Daten validiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle nicht einzeln aufgelisteten Standardchemikalien wurden von den Firmen **Roth** oder **Sigma** bezogen.

Chemikalie/Reagenz

ATP

$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

Bench Mark

Bovine serum albumin (BSA)

CASYton

ECL-Western Lightning

ECL- Super Signal

Enolase

GDP

Gluthathion-Sepharose

GST-RafRBD, GST-gekoppelte Ras-Bindedomäne von Raf

Kollagen TypI

Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Prestained Protein Marker

Protein-A-Sepharose

Trypsin-EDTA-Lösung

1kb Ladder (Smart Ladder)

10kDa Ladder

Bezugsquelle

Sigma

Hartmann Analytic,
Braunschweig

Gibco BRL

ICN

Schärfe System

NEN Life Sciences, Köln

Perbio Science, Bonn

Sigma

Sigma

Amersham Biosciences

Dr. Ignacio Rubio

PromoCell, Heidelberg

TEBU, Frankfurt

NEB

Amersham Biosciences

Gibco BRL

Eurogentec

Gibco BRL

Enzym (mit zugehörigem Puffer)

alkalische Phosphatase

EcoR1

Sma1

Sac1

T4-Ligase

Bezugsquelle

Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim

NEB

NEB

NEB

Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim

2. Material und Methoden

Antikörper

anti-pan-Akt-Antikörper, polyklonal, Kaninchen	Upstate Biotechnologies
anti-Phospho-Akt-Antikörper, polyklonal, Kaninchen	Upstate Biotechnologies
anti-Dcp-1-Antikörper 143.41, monoklonal, Maus	Dr. Antonio Gaya Barcelona, Spanien
anti-pan-Erk-Antikörper, monoklonal, Maus	Transduction Laboratories, Heidelberg
anti-Phospho-p42/p44 Erk-Antikörper, monoklonal, Maus	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Kaninchen-Antikörper, Meerrettich Peroxidase gekoppelt, Ziege	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-Maus-Antikörper, Meerrettich Peroxidase gekoppelt, Ziege	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-Ha-Ras-Antikörper, monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-Ki-Ras-Antikörper, monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-N-Ras-Antikörper, monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-pan-Ras-Antikörper, monoklonal Maus	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-PDGFβ-R-Antikörper, monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-c-Src-Antikörper, polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA
anti-PY215-Src-Antikörper, monoklonal, Maus	Biosource Deutschland GmbH
anti-PY418-Src-Antikörper, monoklonal, Maus	Biosource Deutschland GmbH
anti-PY529-Src-Antikörper, monoklonal, Maus	Biosource Deutschland GmbH
anti-v-src(Ab1)-Antikörper, Agarose gekoppelt	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

Inhibitoren

Aprotinin	Bayer (Trasylol®)
Benzamidin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem
Pefabloc	Roche, Mannheim
Pepstatin A	Sigma
SU6656 (Src-Kinasen-Inhibitor)	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Wortmannin	Sigma

2.2. Geräte/ Verbrauchsmaterial

Zellkulturkomponenten

Anhydrotetracyclin (ATC)	Fisher Scientific
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL
ECGS (endothelial cell growth serum)	Sigma
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL
Geneticin, G418	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin	Bio Whittaker Europe
Human-Serum	Bio Whittaker Europe
Hygromycin B	Boehringer
L-Glutamin	Biochrome
Lipofectamin Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
M199	Bio Whittaker Europe
Serum von neugeborenen Kälbern - NCS	Gibco BRL

Bezugsquelle

Gegenstand

Boyden-Kammer, modifiziert (48-well micro chemotaxis chamber AP48)	Neuro Probe, Inc
DC-Platte (Silica Gel 60)	Merck
Neubauer-Zellzählkammer	Fein-Optik
Polycarbonat-Membran, 25x80mm, Porengröße 8 µm	COSTAR
PVDF-Membran	Millipore
Röntgenfilme (Kodak BioMax MR-1 Film)	Sigma
Zellkulturflaschen klein (75 ml)	Nunc
Zellkulturschalen (94 mm Durchmesser)	Greiner
Zell-Zählgerät	Schärfe-System
96-Lochplatten	Greiner
6-Lochplatten	Greiner
DNA-Präparations Kit (Maxi-Kit)	Quiagen
DNA-Präparations Kit (Mini-Kit)	Quiagen

Bezugsquelle

2. Material und Methoden

2.3. DNA/ Plasmide

DNA/ Plasmid	Bezugsquelle
humane Dep-1, Wildtyp, DNA in psV7d	Dr. Arne Östman, Uppsala, Schweden
humane Dep-1-C1239S-Mutante-vsv, DNA in pRK5	Dr. Steffen Groß
pNRTIS33, tet-off-regulierbarer Expressionsvektor	Dr. Tencho Tenev

2.4. Zellen

Linie	Bezugsquelle
hTERT-BJ1 Humane Vorhaut-Fibroblasten, immortalisiert mit humaner Telomerase	Clontech
E.coli XL1blue	Stratagene
NIH-3T3	American Type Culture Collection in Manassas, USA
PAE (Schweine-Aorta-Endothel-Zellen) Klon ZnR5, stabil transfiziert mit PDGF β -Rezeptor	Dr. Karsten Denner
PAE Klon X23, stabil transfiziert mit PDGF β -Rezeptor und Dep-1-Wildtyp-vsv, Phosphatase Expression abschaltbar durch Atc nach Tet-off-System	Dr. Karsten Denner
PAE Klon D19, stabil transfiziert mit PDGF β -Rezeptor und PTP α -vsv, Phosphatase Expression abschaltbar durch ATC nach Tet-off-System	Dr. Karsten Denner
Fibroblasten aus PTP1B-k.o.-Mäusen, immortalisiert mit dem T-Antigen des SV40-Virus	Dr. Fawaz Haj, Boston
Fibroblasten aus PTP1B-k.o.-Mäusen, immortalisiert mit dem T-Antigen des SV40 Virus, rekonstituiert mit menschlicher PTP1B-Wildtyp	Dr. Fawaz Haj, Boston

2. Material und Methoden

2.5. Puffer

Coomassie	Entfärber:
2g/l Coomassie R250	10% Essigsäure
10% Essigsäure	25% Ethanol
50% Ethanol	
Lösung für Zellfärbung:	Laufpuffer (LP):
0,5% Kristallviolett	384 mM Glycin
20% Methanol	50 mM Tris-HCl pH 8,7
	0,1% SDS
Lysispuffer:	Lysispuffer für Ras-Pulldown:
50mM HEPES pH7.5	50 mM Tris/HCl pH 7.5
150mM NaCl	1 mM EGTA
1.5mM MgCl ₂	150 mM NaCl
1mM EDTA	5 mM MgCl ₂
1% Triton X100	1 % NP-40
1% Natriumdesoxycholsäure	1mM Dithiothreitol (DTT)
0.1% SDS	Inhibitoren wie im Lysispuffer
10% Glyzerin	
10 mM Natriumpyrophosphat	
1mM Dithiothreitol (DTT)	
Inhibitoren (1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml PepstatinA, 200 KIE/ ml Aprotinin, 1mM PMSF, 1mM Benzamidin, 0,1mg/ml Pefablock, 1mM Natriumorthovanadat)	
5xKCM:	Kinasepuffer für <i>in vitro</i> Src Kinase Assay:
0,5M KCl	100mM HEPES pH7.4
0,15M CaCl ₂	10mM MgCl ₂
0,25M MgCl ₂	10mM MnCl ₂
	200mM β-Mercaptoethanol
NET-G-T:	Phosphate Buffered Saline (PBS):
50mM Tris-HCl pH7.5	136 mM NaCl
150mM NaCl	2,7 mM KCl
5mM EDTA	0,01 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
0.02% Gelatine	0,007 mM KH ₂ PO ₄
0.05% TritonX100	
6xProbenpuffer (PP):	Puffer A
30% β-Mercaptoethanol	25mM HEPES pH 7,5
40% Glycerin	100mM NaCl
7% SDS	1mM EDTA
Bromphenolblau	

2. Material und Methoden

Puffer B

25mM HEPES pH 7,5
100mM NaCl
1mM EGTA

Sammelgelpuffer (SGP):

0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,4% SDS

Strip-Puffer:

62,5 mM Tris-HCl pH 6,7
100mM β -Mercaptoethanol
2% SDS

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7,4
1mM EDTA

Transferpuffer (TP):

39 mM Glycin
48 mM Tris-HCl pH 9
20% Methanol
0,037% SDS

Trenngelpuffer (TGP):

1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,4% SDS

2.6. Kulturmedien

LB Medium:

(Luria-Bertani Medium)

10 g/l Bacto Peptone

5 g/l Hefeextrakt

10g/l NaCl

Hungermedium:

DMEM

1 mg/ml BSA

G418, Hygromycin, ATC in Abhängigkeit
vom Bedarf der Zellen, siehe entsprechende
Wachstumsmedien

Transfektionsmedium

für hTERT BJ1-Zellen:

80% M199

15% FCS

5% Human-Serum

0,09% Heparin

0,25% ECGS

0,7mM L-Glutamin

Wachstumsmedium

für NIH-3T3-Klone:

DMEM

10% NCS

600 μ g/ml G418 oder 150ng/ml ATC

2. Material und Methoden

Wachstumsmedium	DMEM
für PAE-Zellen:	10% FCS
	200µg/ml Hygromycin
	-/+ 100ng/ ml ATC
Wachstumsmedium	DMEM
für PTP1B-k.o.-Fibroblasten:	10% FCS
	200µg/ml Hygromycin

2.7. Klonierung der Dep-1 Varianten

Dep-1-Wildtyp (wt) und die Dep-1-C/S-Mutante wurden aus den Ausgangsplasmiden durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym EcoR1 ausgeschnitten. Nach Zwischenklonierung in den Vektor psV7d wurde der vsv-Anhang von der Dep-1-C/S-Mutante durch Verdau des Plasmids mit SacI entfernt. Die Öffnung der Zielvektoren pNRTIS33 bzw. psV7d erfolgte ebenfalls durch Spaltung mit EcoR1, und anschließend wurden sie durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Religation zu reduzieren. Die Restriktionsspaltungen und die Vektor-Dephosphorylierung erfolgten dabei mit folgenden Ansätzen:

Restriktionsansatz:

Dephosphorylierung mit alk.
Phosphatase:

Plasmid-DNA	25µl	geöffneter Vektor	25µl
10x EcoR1 Puffer	4µl	10x Dephosph.-Puffer	5µl
Wasser	9µl	Wasser	18,5µl
EcoR1	2µl	alk. Phosphatase	1,5µl
gesamt:		gesamt:	50µl

Die Spaltungen wurden anschließend durch Gel-Elektrophorese in 1-3% igen Agarosegelen aufgetrennt, die gewünschten Fragmente unter Verwendung eines Gel-Extraktionskits von Qiagen nach dem zugehörigen Protokoll aus dem Gel extrahiert und in 25µl BE-Puffer aufgenommen. Die Vektoren pNRTIS33 und psV7d wurden zusätzlich durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt.

2. Material und Methoden

Mittels T4-DNA-Ligase wurden Dep-1wt und Dep-1 C/S in den pNRTIS33 Vektor bzw. Dep-1CS zuvor in psV7d eingefügt. Die Ligation erfolgte für 5h bei 18°C nach folgendem Schema:

Ligationsansatz:

Dep-1wt bzw. C/S	4µl (0,6µg bzw. 0,7µg)
Vektor	2µl (0,16µg)
10x rATP	2µl
10x Ligase-Puffer	2µl
Wasser	8µl
T4 Ligase	2µl
<hr/>	
gesamt:	<u>10µl</u>

50% der Ligationsansätze wurden anschließend mittels KCM-Methode in kompetente E.coli-XL1blue-Zellen transformiert. Nach dem Austreichen der E.coli auf LB-Agarplatten mit 75µg/ml Ampicillin und Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurde einige Kolonien durch Minipräparation (Quiagen Protokoll) und Kontrollspaltungen mit EcoR1, Sac1 und Sma1 darauf hin getestet, ob sie die eingefügten Fragmente in der richtigen Orientierung enthalten.

Ansatz für Kontrollspaltungen:

Minipräp-DNA	5 µl (25%)
10x Puffer	2µl
Wasser	12,5µl
Restriktionsenzym	0,5µl
<hr/>	
gesamt:	<u>40µl</u>

Positive Klone wurden zur Herstellung größerer DNA Mengen für den Ansatz von 100ml-Kulturen und nachfolgender Maxipräparation (Qiagen Kit und Protokoll) verwendet. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit einer Konzentration von 1µg/µl in TE-Puffer aufgenommen.

2.8. Zellkultur und Konstruktion stabil Dep-1-wt und Dep-1-C/S exprimierender NIH-3T3-Zelllinien

Die routinemäßige Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in T75-Zellkulturflaschen in den unter 2.6. beschriebenen Wachstumsmedien. Die Zellen

2. Material und Methoden

mit ATC-abhängiger Phosphataseexpression wurden dabei vor jedem Experiment für 3-4 Tage parallel sowohl im induzierten (kein ATC) als auch im nicht induzierten (+ATC, 100ng/ml bzw. 150ng/ml) Zustand kultiviert. Nach einem Zeitraum von maximal 3 Monaten wurden die Kulturen jeweils aus Gefrierkonserven neu gestartet. Für die Einsaat in andere Kulturgefäße (Versuchsvorbereitung, Splitten) wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin/ EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst, im entsprechenden Wachstumsmedium resuspendiert, falls erforderlich gezählt und verdünnt und anschließend in das neue Gefäß überführt.

Für die Transfektion der NIH-3T3-Zellen mit den Dep-1wt-pNRTIS33- und Dep-1C/S-pNRTIS33-Konstrukten fand die LipofektaminPlus-Methode Verwendung, bei der die DNA zuerst mit Lipiden komplexiert wird und in den gebildeten Vesikeln von den Zellen aufgenommen werden kann. Die Transfektion erfolgte in 6-Loch-Platten nach folgendem Schema:

2µl (1µg/µl) DNA	10µl Lipofektamin
+5µl Plus Reagenz	+250µl DMEM
+250µl DMEM	

--> 20min Inkubation bei Raumtemperatur

--> Vereinigung der beiden Ansätze

--> 20min Inkubation bei Raumtemperatur

--> Zugabe zu Zellen mit 1,5ml Wachstumsmedium

--> nach 3h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ Zugabe weiterer

2ml Wachstumsmedium pro Loch

--> nach 24h Mediumwechsel

--> nach 48h Beginn der Selektion

Transfizierte Zellen wurden anschließend durch Kultivierung in Wachstumsmedium mit 600µg/ml G418 selektiert. Von den überlebenden Zellen konnten durch Ausdünnen und weitere Selektion Einzelklone gewonnen werden, die durch SDS-Page und Immublotting (siehe 2.9.) auf ihre induzierbare Dep-1 Expression getestet wurden. Aufgrund der tricistronischen Beschaffenheit des Expressionsvektors (siehe 3.1.) konnte die Selektion der Klone nur im induzierten Zustand erfolgen, d.h. unter ständiger Expression der Phosphatasevarianten. Die Zugabe des ATC kann nur bei Abwesenheit des G418 erfolgen.

2.9. SDS-PAGE und Immunblotting

Die Kombination dieser beiden Methoden dient der Trennung und dem Nachweis von Proteinen bzw. Modifikationen an Proteinen wie z.B. Phosphorylierung. Die Bedingungen für die einzelnen Schritte sind in den Tabellen 2-I und 2-II zusammengefasst. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen unter den entsprechenden Bedingungen in 6-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert, wenn nötig gehungert und stimuliert und anschließend in 0,5ml Lysispuffer lysiert. Für SDS-Page wurden dann 10% (50µl) der Lysate mit 6x Probenpuffer versetzt, 5min bei 100°C gekocht und auf das PAA-Gel aufgetragen.

PAA-Gel	PAA-Konzentration	Elektrophorese-bedingungen
Maxi-Gel (16cm x 18cm)	10%	45V, 400mA Lauf über Nacht
Midi-Gel (10cm x 12cm)	10%	200V, 25mA
Mini-Gel (10cm x 8,3cm)	7,5%; 10%; 12,5%	200V, 30mA

Tabelle 2-I: Bedingungen für die PAA-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Gele wurden anschließend entweder mit Coomassie gefärbt und getrocknet oder zum Immunoblotting verwendet. Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels Semi-Dry-Verfahren bei 25V und 2mA/ cm² Membran für 1,5h. Die Antikörper wurden in NET-G-T verdünnt, das auch zum Blocken und Waschen (3x 8min) der Membranen benutzt wurde.

2. Material und Methoden

Antikörper	Inkubationsbedingungen
anti-Dep-1; 1:5000 (0,3µg/ml)	Blocken: 1h, RT; Antikörper-Inkubation: ü.N., 4°C
anti-pan-Erk; 1:2500	Blocken: ü.N., 4°C; Antikörper-Inkubation: 1h, RT
anti-Phospho-p42/p44 Erk; 1:2000	Blocken: 1h, RT; Antikörper-Inkubation: ü.N., 4°C
anti-pan-Akt; 1:2500	Blocken: ü.N., 4°C; Antikörper-Inkubation: 1h, RT
anti-Phospho-Akt; 1:2000	Blocken: 1h, RT; Antikörper-Inkubation: ü.N., 4°C
anti-Ras; 1:1000	Blocken: 1h, RT; Antikörper-Inkubation: ü.N., 4°C
anti-PDGFβ-R; 1:2500	Blocken: ü.N., 4°C; Antikörper-Inkubation: 1h, RT
anti-c-Src; 1:3000	Blocken: ü.N., 4°C; Antikörper-Inkubation: 1h, RT
anti-PY-Src; 1:2500	Blocken: 1h, RT; Antikörper-Inkubation: ü.N., 4°C
anti-Kaninchen, HRP gekoppelt; 1:5000	Antikörper-Inkubation: 1h, RT
anti-Maus HRP gekoppelt, 1:5000	Antikörper-Inkubation: 1h, RT

Tabelle 2-II: Bedingungen für Antikörper-Inkubation und Blocken der Membranen
RT-Raumtemperatur, ü.N.-Über Nacht

Die Proteine wurden durch eine Chemolumineszenz Reaktion der Meerrettich Peroxidase (HRP) mit ECL-Western Lightning bzw. ECL-Super Signal als Substrat auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.10. Migrationsassay

Mit diesem Test ist es möglich, Bewegung von Zellen durch eine Polycarbonat-Membran sowie den Einfluss eines chemotaktischen Lockstoffes und/oder anderer Signale zu beobachten. Als Messgröße dient die Zahl der Zellen, die in einem bestimmten Zeitraum durch die Membran gewandert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Migration von Zellen mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht. In die Löcher der unteren Kammerhälfte wurden 27µl Hungermedium, PDGF-BB in verschiedenen Konzentrationen oder Medium mit 10% FCS als Kontrolle eingefüllt. Je eine Spalte diente der Vierfachbestimmung eines Messpunktes. Die Löcher wurden mit einer Polycarbonat-Membran (Nucleopor, 8µm Porengröße) bedeckt, die über Nacht mit Kollagen (Kollagen TypI, 30µg/ml in PBS) beschichtet und dann getrocknet wurde. Anschließend wurde die Kammer mit der Silikondichtung und der oberen Hälfte komplettiert, so dass in deren Löcher je 52µl Zellsuspension mit ca. 4×10^4 Zellen in DMEM+2,5 mg/ml BSA mit und ohne Phosphatase parallel in jeweils eine

2. Material und Methoden

Hälfte der Kammer pipettiert werden konnten. So war ein direkter Vergleich der entsprechenden Werte innerhalb eines Experiments möglich. In den meisten Fällen fand folgendes Schema Verwendung:

Löcher oben	Phosphatase exprimiert					Phosphatase nicht exprimiert				
Löcher unten	0 ng/ml PDGF	3 ng/ml PDGF	10ng/ml PDGF	30ng/ml PDGF	10% FCS	0 ng/ml PDGF	3 ng/ml PDGF	10ng/ml PDGF	30ng/ml PDGF	10% FCS

Beim Einfüllen waren Luftblasen möglichst zu vermeiden. Nach 4h im Inkubator (37°C, 5% CO₂) wurde die Kammer auseinander genommen, die Membran mit 0,5% Kristallviolett in 20% Methanol gefärbt und mit der Unterseite nach unten auf einem Objekträger fixiert. Abschließend waren die Zellen auf der Oberseite mit einem Wattestäbchen zu entfernen. Die Bestimmung der Zahl der migrierten Zellen erfolgte durch Auszählung eines 4x4-Feldes einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop und Mittelwertbildung aus den 4 parallelen Ansätzen.

2.11. Adhäsionsassay

Dieser Test dient der Messung der relativen Geschwindigkeit, mit der Zellen an eine extrazelluläre Matrix anheften. Die Zahl der adhärenierten Zellen nach einem bestimmten Zeitraum entspricht dabei einem Lichtabsorptionswert, der unter gleichen Bedingungen einen qualitativen Vergleich zwischen verschiedenen Zelllinien zulässt (30). Dazu wurden 96-Lochplatten über Nacht bei 4°C mit einer Matrix beschichtet (30µg/ml Kollagen in PBS, 10µg/ml Fibronectin in PBS), zweimal mit PBS gewaschen und getrocknet. Danach war es erforderlich die Zellen vorsichtig zu trypsinieren, mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml in DMEM mit 2,5 mg/ml BSA bzw. 10% FCS zu suspendieren und davon 100µl pro Loch in die 96-Lochplatte einzufüllen. Die Platten wurden bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellsuspension der entsprechenden Reihen abgesaugt, und die verbleibenden Zellen konnten fixiert und gefärbt werden (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol). Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von je 100µl 0,1M Zitronensäure zum Lösen der gefärbten Zellen und die Messung der Lichtabsorption bei 570nm Wellenlänge.

2.12. Bestimmung der adhäsionstimulierten Src-Aktivität

Zunächst wurden die Zellen vorsichtig trypsiniert, mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in DMEM +2,5mg/ml BSA +0,1% FCS resuspendiert, zweimal mit dem gleichen Medium gewaschen und bei 37°C auf einem Rad inkubiert. Jeweils 2 ml der so behandelten Zellen mit und ohne Phosphataseexpression wurden in parallelen Ansätzen in 35mm-Zellkulturschalen eingesät, zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Medium mit nicht angehefteten Zellen abgenommen. Die verbleibenden Zellen wurden in 500µl Lysispuffer lysiert und mit den abzentrifugierten Zellen aus dem abgenommenen Überstand vereinigt. Nachdem die Zelltrümmer durch Zentrifugation der Lysate bei 14000 U/min entfernt worden waren, erfolgte die Immunpräzipitation von Src aus den Lysaten mit einem Agarose-gekoppelten Anti-v-Src-Antikörper für 3h bei 4°C auf dem Rad. Anschließend wurden die IP dreimal mit Lysispuffer und zweimal mit Kinasepuffer gewaschen und ca. 10% für die Bestimmung der relativen Src-Menge in den Immunpräzipitaten mittels anti-c-Src Immuno Blot, entnommen. Der Kinaseassay erfolgte nach einem Protokoll von Bagrodia et al. (8). Hierzu wurde das verbleibende Src-Protein in den IP in 36 µl Kinasepuffer aufgenommen und mit 4µl Substratmix (25µM [³²P]ATP - 10µCi Endkonzentration, 1µM kaltes ATP Endkonzentration, 5µg säuredenaturierte Enolase) für 30min bei 37°C inkubiert. Die Säuredenaturierung der Enolase erfolgte unmittelbar vor Zugabe zum Substratmix durch Inkubation mit 10mM Essigsäure (1:1) für 5min bei 37°C. Die Kinase-Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl Auftragspuffer gestoppt, so dass nachfolgend die Src Aktivität mittels SDS-Page der Proben und Autoradiographie nach Coomassie Färbung und Trocknen des Gels bestimmt werden konnte.

2.13. Bestimmung der PDGF-stimulierten Src-Aktivität

Etwa 60.000 PAE-X23 Zellen pro Loch wurden in 6-Loch-Platten eingesät und jeweils parallel mit oder ohne ATC bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen kultiviert. Nach Hungern der Zellen über Nacht wurden sie mit 50ng/ml PDGF-BB für die angegebenen Zeiträume stimuliert, nach 1x Waschen mit PBS in 0,5ml Lysispuffer lysiert und 25min bei 4°C und 14.000 U/min zentrifugiert. Die Immunpräzipitation von v-Src, der *in vitro*-Kinaseassay und die Auswertung erfolgten analog wie in 2.12. beschrieben.

2.14. Ras-Pulldown

Grundlage für diesen Assay ist die Tatsache, daß Raf nur an aktives, GTP beladenes Ras binden kann. Deshalb ist es möglich mit der GST gekoppelten Ras-Bindedomäne von Raf spezifisch nur aktives Ras aus einem Lysat zu präzipitieren (50). Zu diesem Zweck wurden Zellen mit und ohne exprimierte Phosphatase in parallelen Ansätzen mit gleichen Zellzahlen in 6-Loch-Platten eingesät. Nachdem die Zellen über Nacht in Hungermedium kultiviert worden waren, erfolgte ihre Stimulation mit 50ng/ml PDGF-BB für die angegebenen Zeiträume. So schnell wie möglich wurden die Zellen anschließend in 300µl Ras-Lysispuffer, der zusätzlich 100 µM GDP und 20 µg GST-RafRBD enthielt, lysiert und 15min bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Nach Zugabe von 20µl Gluthathion-Sepharose und 30min Inkubation bei 4°C auf dem Rad wurden die Präzipitate drei Mal mit kaltem Lysispuffer gewaschen und in 30µl 2fach-Auftragspuffer aufgenommen. Das gebundene und damit aktivem Protein entsprechende Ras konnte mittels SDS-PAGE und Immunblot mit einer Mischung verschiedener anti-Ras-Antikörper (anti-pan-Ras, anti-Ki-Ras, anti-N-Ras, anti Ha-Ras, jeder 1:1000 in NET-G-T) sichtbar gemacht werden.

2.15. Bestimmung der PDGF stimulierten PI3-Kinase-Aktivität

Etwa 60.000 PAE-X23 Zellen pro Loch wurden in 6-Loch-Platten eingesät, jeweils parallel mit und ohne ATC bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen kultiviert und über Nacht gehungert. Nach Stimulation der Zellen mit 50ng/ml PDGF-BB und Vorinkubation mit Wortmannin für 30min (wenn angegeben) wurden die Zellen in 0,5ml Lysispuffer lysiert und für 25min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation des PDGFβ-R mit assoziierter PI3-Kinase mit jeweils 0,4µg anti-PDGFβ-R-Antikörper für 3h bei 4°C. Danach wurden die IP auf Eis zweimal mit PBS/ 1% NP-40, jeweils einmal mit PBS, mit 0,1M Tris-HCl pH 7,5/ 0,5M LiCl, mit Wasser und mit PufferA gewaschen und in 25µl PufferB mit 0,2µg Ultraschall-behandeltem Phosphatidylinositol als Substrat resuspendiert. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der ATP-Mix (5µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, kaltes ATP, ATP-Endkonzentration insgesamt 200µM) und 10mM MgCl₂ (Endkonzentration) zugesetzt und die Reaktion nach 20min bei 37°C mit 100µl Chloroform-Methanol-HCl (50:100:1) gestoppt. Die Lipide konnten aus der organischen Phase durch Waschen mit 200µl Chloroform und 100µl Methanol-1M HCl (1:1)

2. Material und Methoden

extrahiert, getrocknet und in 25µl Chloroform aufgenommen werden. Nachdem die Lipide auf eine mit 1% Kaliumoxalat imprägnierte DC-Platte (Silica Gel 60) aufgetragen und durch Dünnschicht-Chromatografie in Chloroform-Methanol-32% Ammoniak-Wasser (43-38-4,5-7,5) getrennt worden waren, konnte die Intensität der Phosphorylierung densitometrisch mit Hilfe eines PhosphoImagers bestimmt werden.

3. Ergebnisse

Zur Untersuchung von Dep-1, PTP α und PTP1B und ihres Einflusses auf die STW des PDGF β -R stand für jede der drei ausgewählten Tyrosin-Phosphatasen ein zelluläres Modellsystem zur Verfügung. Im Fall von Dep-1 und PTP α handelte es sich um PAE Zellen, die mit der jeweiligen PTP und auch mit dem PDGF β -R stabil transfiziert wurden. Dabei wurden für die Phosphatasen Konstrukte verwendet, deren Transkription mit Hilfe von ATC abgeschaltet werden kann (tet-off-System) und die am C-Terminus einen vsv-Anhang tragen (108). Dieser sogenannte vsv-Tag war für den Nachweis von Dep-1 und PTP α mittels Immunblot oder auch für Immunpräzipitation notwendig, da zunächst kein geeigneter Antikörper gegen die Phosphatase existierte. Die zur Untersuchung von PTP1B verwendeten Zellen dagegen waren aus k.o. Mäusen gewonnene Fibroblasten, die künstlich mit dem SV40-T-Antigen immortalisiert und nachträglich entweder mit einem leeren Kontrollvektor oder mit menschlicher Wildtyp-PTP1B rekonstituiert worden waren. Da PDGF-Rezeptoren in Fibroblasten endogen vorkommen und die Verwendung transfizierter PAE-Zellen kein optimales Zellmodell darstellt, sollten für Dep-1 neue, auf Fibroblasten basierende, Zelllinien hergestellt werden. In diesen Zellen sollte der bereits bekannte, negativ regulierende Effekt von Dep-1 auf die Signaltransduktion endogener PDGF-Rezeptoren näher charakterisiert und die PTP ohne Epitop-Tag eingesetzt werden. Eine bereits hergestellte, katalytisch inaktive C1239S-Mutante sollte ebenfalls Verwendung finden, um eventuelle dominant negativen Effekte dieser PTP-Version auf die endogene Dep-1 zu erfassen.

3.1. Konstruktion der Dep1wt und Dep-1C/S-Expressionsvektoren

Um Unterschiede in den Effekten von Dep-1 durch die Untersuchung verschiedener Zellklone ausschließen zu können, sollte wieder ein Konstrukt hergestellt werden, dessen Expression auch durch ATC unterdrückt werden konnte. Damit ist es möglich, das Verhalten der Zellen bei An- und Abwesenheit der Phosphatase im selben Klon zu beobachten. Als Zielvektor sollte ein Plasmid mit der Bezeichnung pNRTIS33 verwendet werden, auf dem sich nach dem Einfügen das Dep-1-Gen direkt hinter dem Gen für den Tetracyclin abhängigen Transaktivator (tTa) und dem Gen für die Neomycinresistenz befindet. Diese tricistronische Konfiguration steht unter der

3. Ergebnisse

Kontrolle eines einzigen Promotors, dessen Funktion durch das tTa-Protein in Abhängigkeit von der ATC-Konzentration reguliert wird (Abb. 3-1).

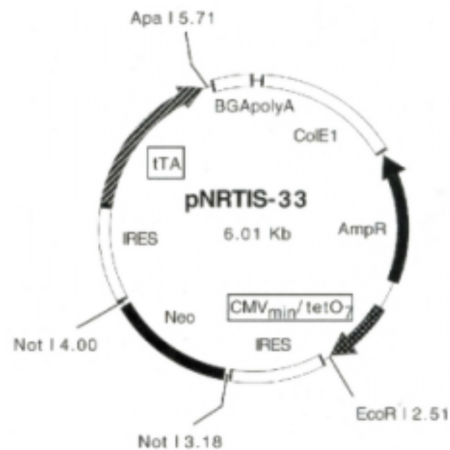


Abb. 3-1 Schematische Darstellung von pNRTIS33

Die einzelnen Schritte der Klonierung, Fragment- und Plasmidaufreinigung wurden mittels Standardtechniken wie in Abschnitt 2.6. beschrieben durchgeführt. In Abbildung 3-2 ist der Ablauf schematisch dargestellt.

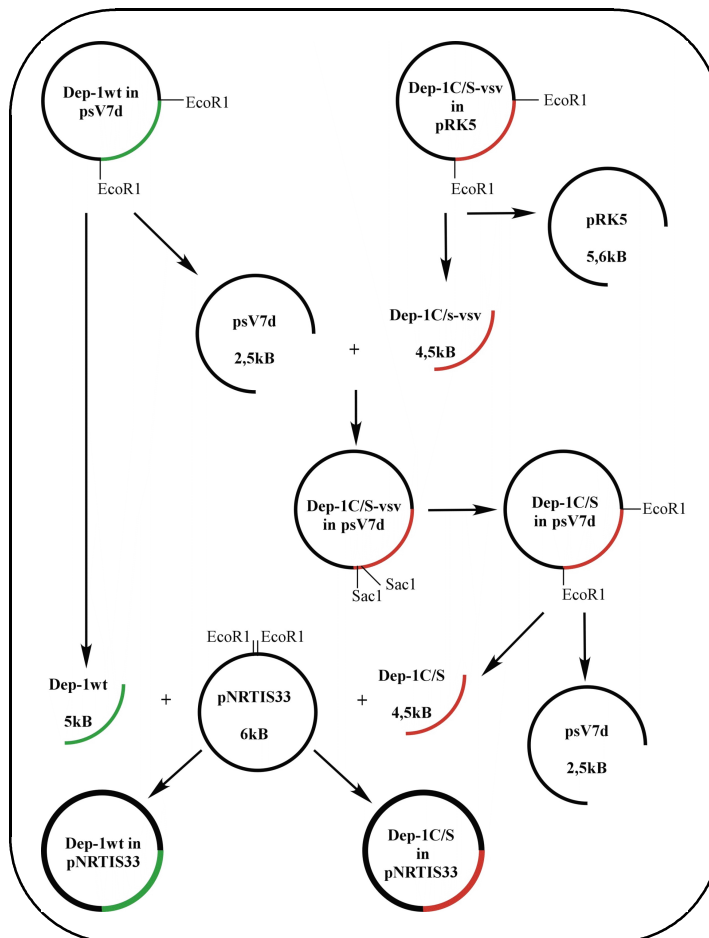


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Konstruktion von Dep1wt in pNRTIS33 und Dep-1C/S in pNRTIS33

3. Ergebnisse

Das Gen für Dep-1 wt war eingefügt in einen psV7d-Vektor vorhanden und konnte aus diesem durch Verdau des Plasmids mit EcoR1 ausgeschnitten werden. Mit dem gleichen Restriktionsenzym wurde pNRTIS33 im "Multi-Clonig-Site" geöffnet (Abb.3-3).

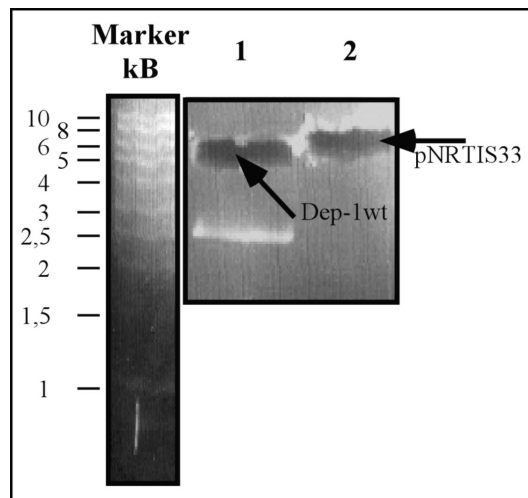


Abb. 3-3: Restriktionsspaltung von (1) Dep-1wt-psV7d und (2) pNRTIS33 mit EcoR1 (1%iges Agarose-Gel), markierte Fragmente wurden aus dem Gel für weitere Verwendung extrahiert

Da die Dep-1C/S-Mutante nur als Version mit vsv-Tag in einem pRK5-Vektor existierte, sollte der Anhang während der Klonierung entfernt werden. Die vsv-Sequenz wurde zwar von zwei Sac1 Schnittstellen flankiert, ein Verdau mit Sac1 war aber nicht möglich, da sich im Vektor, ebenso wie in pNRTIS33 weitere Sac1 Orte befinden. Deshalb war es notwendig, Dep-1-vsv C/S in ein anderes Plasmid ohne Sac1-Orte zu klonieren. Als geeignet erwies sich psV7d. Dazu wurden beide Ausgangsplasmide mit EcoR1 verdaut (Abb. 3-4).

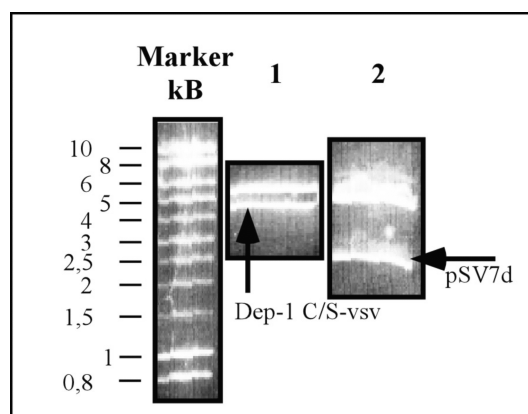


Abb. 3-4: Restriktionsspaltung von (1) Dep-1C/S-vsv-pRK5 und (2) Dep-1wt-psV7d mit EcoR1 (1,5%iges Agarose-Gel), markierte Fragmente wurden aus dem Gel für weitere Verwendung extrahiert

3. Ergebnisse

Durch eine Ligase-Reaktion wurde das Dep-1-vsv-C/S-Fragment in den psV7d-Vektor eingefügt und mit dem Ansatz verfahren, wie unter 2.7. beschrieben. Zwei Klone mit den richtigen Fragmentgrößen in den Kontrollspaltungen mit Sac1 (Dep-1C/S-vsv-psV7d, linearisiert, 7kB) und EcoR1 (Dep-1C/S-vsv + psV7d - 4,5kB + 2,5kB) wurden für die weitere Verwendung ausgewählt. Um den vsv-Tag zu entfernen, konnte Dep-1-vsv-C/S in psV7d nun mit Sac1 verdaut (Abb. 3-5) und wieder zu einem geschlossenen Plasmid ligiert werden. Das Gen für die Phosphatase wurde durch Verdau mit EcoR1 aus dem Plasmid ausgeschnitten (Abb. 3-5).

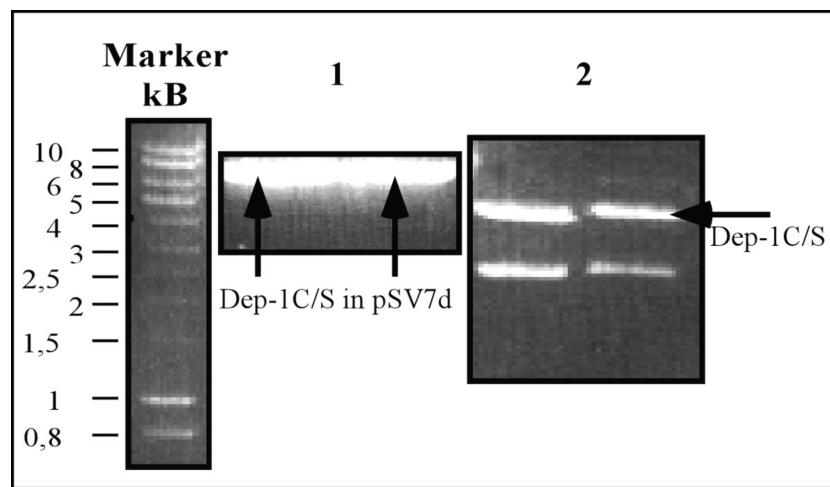


Abb. 3-5: Restriktionsspaltung von (1) Dep-1C/S-vsv-psV7d mit Sac1 und (2) Dep-1C/S-psV7d mit EcoR1 (1%iges Agarose-Gel), markierte Fragmente wurden aus dem Gel für weitere Verwendung extrahiert

Dep-1 wt und Dep-1 C/S konnten nun durch eine Ligase-Reaktion in das durch EcoR1 geöffnete pNRTIS33-Plasmid eingefügt werden. Einige Plasmide wurden durch Verdau mit EcoR1 (Dep-1wt + pNRTIS33: 5kB + 6kB; Dep-1C/S + pNRTIS33: 4,5kB + 6kB) und Sma1 auf Dep-1wt bzw. Dep-1C/S in der richtigen Orientierung (Dep-1wt-pNRTIS33: 7,1kB + 2,8kB; Dep-1C/S-pNRTIS33: 0,11kB + 2,8kB + 0,49kB + 7,1kB) oder falschen Orientierung (Dep-1wt-pNRTIS33: 4,3kB + 3,3kB + 2,8kB; Dep-1C/S-pNRTIS33: 0,11kB + 2,8kB + 4,3kB + 3,3kB) in pNRTIS33 untersucht. Für beide Varianten wurde mindestens ein positiver Klon gefunden (Abb. 3-6), die so erhaltenen Plasmide konnten nachfolgend zur Herstellung Dep-1wt- und Dep-1C/S-exprimierender Zellen verwendet werden. Schematische Darstellungen der Expressionsvektoren sind in Appendix-I zu finden.

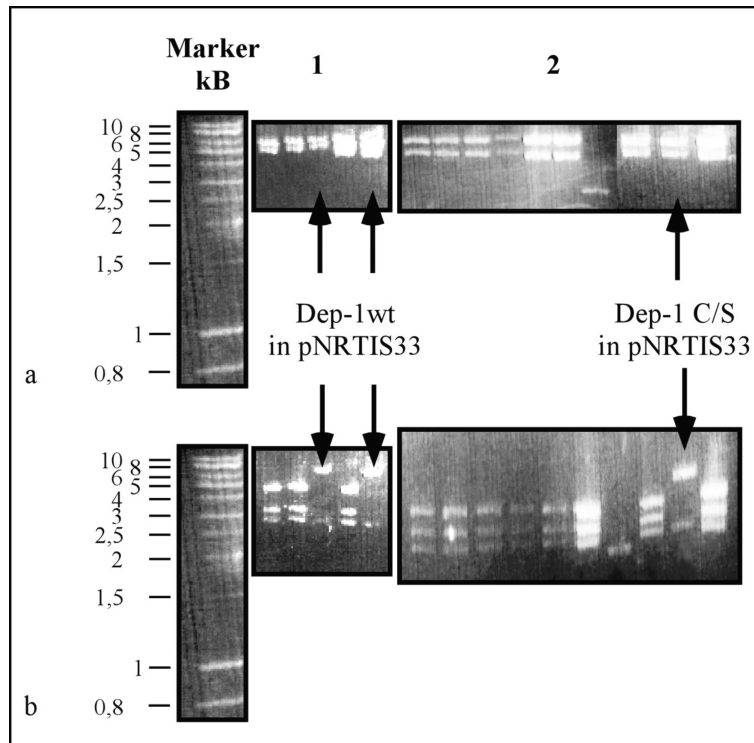


Abb. 3-6: (a) Restriktionsspaltung von Minipräps mit EcoRI zum Nachweis von (1) Dep-1wt-pNRTIS33 und (2) Dep-1C/S-pNRTIS33 (b) Restriktionsspaltung von Minipräps mit SmaI zur Kontrolle, ob sie (1) Dep-1wt in pNRTIS33 und (2) Dep-1C/S in pNRTIS33 in der richtigen Orientierung enthalten (1%iges Agarose-Gel), Die markierten Klone wurden weiter bearbeitet und für die Transfektion von Zellen verwendet.

3.2. Erzeugung von NIH3T3-Zelllinien mit stabiler Dep-1wt- und Dep-1C/S-Expression

Mit den Konstrukten Dep-1wt in pNRTIS33 und Dep-1C/S in pNRTIS33 sollten nachfolgend Fibroblasten transfiziert werden. Zunächst wurde für diesen Zweck die immortalisierte humane Fibroblasten-Zelllinie BJ-1 ausgewählt, um ein möglichst natürliches Modellsystem mit ausschließlich vom Menschen abstammenden Komponenten zur Verfügung zu haben. Des weiteren hatten die Zellen in Vorversuchen eine gute Stimulation z.B. der MAPK und der Migration durch PDGF-BB gezeigt, was eine wichtige Grundlage zur Untersuchung möglicher Effekte der PTP war. Leider schlugen alle Versuche einer Transfektion der BJ-1 Zellen fehl, unabhängig von der angewandten Methode oder DNA. Aus diesem Grund wurden schließlich NIH3T3-Zellen für die Herstellung stabiler Zelllinien verwendet, da diese aus Mäusen stammenden Fibroblasten leicht transfizierbar und einfach kultivierbar sind. Erst zu einem Zeitpunkt, der für Experimente im Rahmen dieser Arbeit zu spät war, konnten auch für die BJ-1 Fibroblasten Bedingungen gefunden werden, unter denen

3. Ergebnisse

Transfektionsraten von ca. 60% mit Lipofektamin erreicht wurden. Dafür ist es nötig, die Zellen wenigstens 48h vor der Transfektion und während der Transfektion bis zur weiteren Verwendung in einem reichhaltigerem Wachstumsmedium zu kultivieren. Die Transfektion selbst erfolgt nach dem LipofektaminPlus-Protokoll (siehe 2.8.). Die Zusammensetzung des Mediums ist im Kapitel 2.6. angegeben.

Die NIH3T3-Zellen wurden, wie unter 2.8. beschrieben, mit den Vektoren pNRTIS33 (mock), Dep-1wt in pNRTIS33 und Dep-1C/S in pNRTIS33 transfiziert, und Einzelklone nach Selektion auf ihre induzierbare Phosphatase-Expression hin durch SDS-PAGE und Immunblotting mit dem anti-Dep-1-Antikörper untersucht. In Abb. 3-7 sind die entsprechenden Bilder einiger Klone gezeigt.

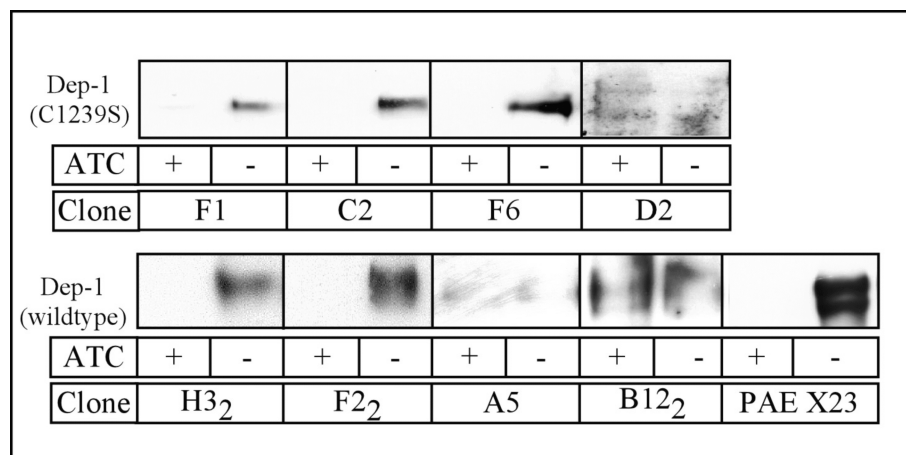


Abb. 3-7: Expression von Dep-1wt und Dep-1C/S in NIH3T3 Klonen und in PAE X23 Zellen
Einzelklone von mit Dep-1wt in pNRTIS33 und Dep-1C/S in pNRTIS33 transfizierten NIH3T3 Zellen bzw. PAE X23 Zellen wurden in 6-Loch Schalen eingesät und mit (Expression ausgeschaltet) und ohne ATC (Expression eingeschaltet) bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 10% der Lysate für SDS-Page und Immunoblotting mit einem anti-Dep-1-Antikörper zur Kontrolle der Phosphatase-Expression verwendet.

Obwohl die Zellen unter den gleichen Bedingungen, einschließlich G418 Konzentration für die Selektion, kultiviert wurden, zeigten die einzelnen Klone deutliche Unterschiede in den Dep-1-Expressionsspiegeln. In einigen selektierten Klonen (z.B. Dep-1wt A5) war auch gar keine Expression der PTP nachweisbar. Ein weiteres Kriterium für die Verwendbarkeit der Linien für nachfolgende Experimente war die Expressionsregulation durch ATC. So blieb in mehreren Klonen (z.B. Dep-1wt B12₂; Dep-1C/S D2) die Menge an Dep-1 unbeeinflusst von der An- oder Abwesenheit von ATC, weshalb diese Zellen für den angestrebten Zweck ebenfalls nicht nutzbar waren. Nur Klone mit regulierbarer Dep-1-Expression (H3₂ - Dep-1wt, F2₂ - Dep-1wt und F6 - Dep-1C/S) wurden für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Die Klone wurden schließlich zwecks leichter Identifikation als **NDW-H3₂**, **NDW-F2₂** und

3. Ergebnisse

NDC-F6 bezeichnet, wobei das N für NIH3T3, D für Dep-1 und W bzw. C für Wildtyp oder C/S-Mutante steht. Damit standen insgesamt folgende PTP-exprimierende Zelllinien für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung:

Dep-1 Wildtyp: PAE-X23; NDW-H3₂; NDW-F2₂

Dep-1 C/S-Mutante: NDC-F6

PTP α Wildtyp-vsv: PAE-D6

PTP1B k.o. Fibroblasten: PTP1B^{-/-}

PTP1B k.o.-Fibroblasten mit rekonstituierter humaner PTP1B: PTP1B^{+/+}

Als nachteilig erwies sich nur der Umstand, daß mit den vorhandenen Antikörpern die Spiegel der endogenen PTP nicht nachweisbar sind. PTP α konnte nur indirekt über den vsv-Anhang dedektiert werden und der monoklonale anti-Dep-1-Antikörper 143.41 erkennt nur ein Epitop im extrazellulären Teil der humanen Dep-1, nicht aber in den homologen Proteinen aus Maus und Schwein. Deshalb ist es nicht möglich, eine genaue Aussage darüber zu treffen, wie stark die Expression der Phosphatasen relativ zu den endogenen Spiegeln ist. Um zumindest einen Hinweis auf das Verhältnis zwischen Überexpression von Dep-1 und den endogenen PTP zu bekommen, wurden gleiche Proteinmengen von Lysaten verschiedener Dep-1-exprimierender Zellen in einem SDS-PAGE mit anschließendem Immunblot analysiert. Dabei sollten die relativen Phosphatase-Mengen bei den Linien HEK293 (humane embryonale Nierenzellen), PAE-X23 (-/+ ATC), NDW-H3₂ (-/+ ATC), NDC-F6 (-/+ATC) und BJ-1 (immortalisierte humane Vorhaut-Fibroblasten) miteinander verglichen werden (Abb. 3-8).

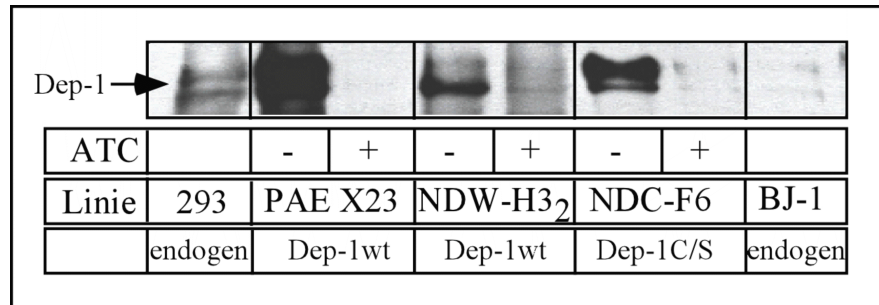


Abb. 3-8: Vergleich der endogenen- und Überexpression von Dep-1 in verschiedenen Zelllinien Die angegebenen Zellen wurden in 6-Loch-Schalen eingesät und, bei Linien mit induzierbarer Phosphatase-Expression mit bzw. ohne ATC, bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteinkonzentrationen nach Bradford bestimmt und 50µg Protein für SDS-PAGE und Immunblot mit anti-Dep-1-Antikörper verwendet.

Der endogene Spiegel von Dep-1 in HEK293- und BJ-1-Zellen ist offenbar relativ niedrig. Die Dep-1-Spiegel in PAE-X23 und NDC-F6 (Dep-1C/S) sind deutlich höher, hier entspricht schon die restliche Expression im nicht-induzierten Zustand der endogenen Expression in den HEK293- und BJ-1-Zellen. NDW-H3₂ weist mit einem ca. 3- bis 5-fach höheren Dep-1-Spiegel als in 293- bzw. BJ-1-Zellen die geringste Überexpression auf. Insgesamt variieren die Dep-1-Spiegel zwischen den verschiedenen Linien sehr stark und liegen bei den transfizierten Zellen deutlich über endogenem Niveau. Im Falle der Überexpression der Dep-1C/S-Mutante könnten damit günstige Bedingungen für einen dominant negativen Effekt bestehen.

3.3. Proliferation unter Einfluss der PTP

Während der Selektionsphase war auffällig, dass die Zahl positiver Klone von Dep-1wt-transfizierten Zellen deutlich niedriger lag als deren Zahl bei Dep-1C/S-transfizierten Zellen. Da die Zellen nur mit induzierter Phosphatase selektiert werden konnten, ist dies möglicherweise ein Hinweis auf eine wachstumshemmende Funktion von Dep-1. Ein ähnliches Phänomen wurde z.B. auch von Jeanne E. Baker et al. für Jurkat-Zellen beschrieben (9). Mit den für diese Arbeit zur Verfügung stehenden, sowohl Dep-1- als auch PTPα-exprimierender PAE- bzw. NIH3T3-Zelllinien konnte die Frage des Einflusses der PTP auf Zellteilung und -wachstum allerdings nicht zweifelsfrei geklärt werden. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren bei Kultur in normalem Medium mit 2% oder 10% FCS unterschied sich die Proliferation nicht (Daten nicht gezeigt). Die Experimente bezüglich der PDGF-BB- und Serum-stimulierten Proliferation ergaben mehrheitlich, wegen der sehr geringen

3. Ergebnisse

Stimulation, keine Aussage über einen Effekt der Phosphatasen auf die Wachstumsfaktor-induzierte Zellteilung. Auch die DNA-Syntheserate konnte nur wenig durch PDGF-BB oder FCS stimuliert werden, und Messungen unter dem Gesichtspunkt der Auswirkungen von Dep-1 und PTP α lieferten keine eindeutigen Resultate (Daten nicht gezeigt). Eine klare Aussage über den Effekt von PTP α und Dep-1 ist deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Mit den PTP1B-k.o.-Fibroblasten sowie den mit PTP1B rekonstituierten Fibroblasten wurden keine Untersuchungen bezüglich Zellteilung und Zellwachstum durchgeführt. Aufgrund der Immortalisierung mit dem SV40-T-Antigen zeigen diese Zellen bereits ein verändertes Proliferationsverhalten, und im Vergleich der beiden Linien wurde ebenfalls kein eindeutig der Aktivität der Phosphatase zuzuordnender Proliferations-Effekt erwartet.

3.4. Effekt der Protein-Tyrosin-Phosphatasen auf die Zellmigration

Zellmigration ist Grundlage verschiedener biologischer Vorgänge unter Beteiligung von PDGF z.B. bei der Wundheilung und der Embryonalentwicklung (siehe auch Abschnitt 1.3.2.). Unter Verwendung einer modifizierten Boyden-Kammer mit einer Polycarbonat-Membran als zu überwindende Barriere (siehe 2.10.) sollte erforscht werden, ob die verschiedenen PTP einen Einfluss auf die PDGF-induzierte Migration der Zellen ausüben.

3.4.1. PDGF-BB als chemotaktischer Lockstoff

Primär war die durch PDGF-BB angeregte Migration von Interesse, aber auch andere Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF-AA, FGF, EGF oder auch LPA wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Stimulation der Zellmigration untersucht. Allerdings erwiesen sich alle Faktoren mit Ausnahme des PDGF-BB als ungeeignet für eine Verwendung als chemotaktischer Lockstoff in diesem Versuchssystem, da die verwendeten Zelllinien entweder keine oder bei höheren Konzentrationen des Liganden nur eine schwache Steigerung der Migration zeigten. In Abb. 3-8 sind stellvertretend die Ergebnisse zweier Experimente mit PDGF-BB- und FGF-stimulierter Migration von PAE-D19-Zellen ohne PTP α -Expression (+ATC) im Vergleich mit den BJ-1-Fibroblasten dargestellt. Dabei sind die Intensitätswerte der PAE-D19-Zellen bei

3. Ergebnisse

Stimulation mit 10%FCS und bei den BJ-1-Zellen mit 30ng/ml PDGF-BB gleich 1 gesetzt, um den direkten Vergleich zu erleichtern.

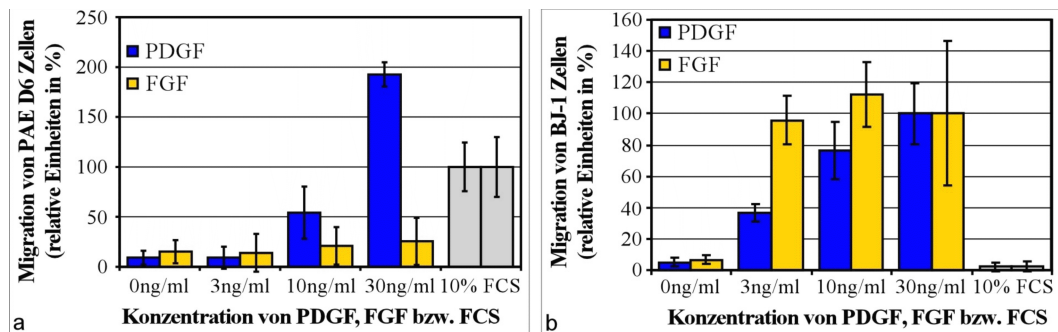


Abb. 3-8: FGF- und PDGF-stimulierte Migration von PAE-D6- und BJ-1-Zellen (a) Migration von PAE-D19-Zellen ohne PTP α -Expression (+ATC) in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch verschiedene Konzentrationen von FGF oder PDGF, 10% FCS oder unstimuliert. Zahl der Zellen bei 10%FCS wurde gleich 100% gesetzt. (b) Migration von BJ-1-Zellen in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch verschiedene Konzentrationen von FGF oder PDGF, 10% FCS oder unstimuliert. Zahl der Zellen bei 30ng/ml PDGF-BB wurde gleich 100% gesetzt.

Nach 4h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ wurden die durch eine Kollagen-beschichtete Polycarbonat-Membran gewanderten Zellen fixiert, gefärbt und die Zellen in einem 4x4 Feld einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Balken sind Mittelwerte der vier parallelen Werte eines Experiments, repräsentativ für drei unabhängige Versuche. Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen.

Bei den PAE-D19-Zellen steigt im Falle der Stimulation mit FGF die Zahl der migrierten Zellen bei den einzelnen Konzentrationen kaum über den unstimulierten Wert an, während bei PDGF-BB schon ab 3ng/ml die Anzahl der gewanderten Zellen sichtbar ansteigt. Häufig war der stimulatorische Effekt von 30ng/ml PDGF-BB sogar höher als der des FCS, das als Positivkontrolle verwendet wurde. Bei den BJ-1-Fibroblasten dagegen war FGF in niedrigen Konzentrationen sogar ein besseres Motogen als PDGF. Bei einer Konzentration der Wachstumshormone von 30ng/ml war die Zahl der migrierten Zellen in etwa gleich. Leider konnten wie bereits erwähnt die BJ-1-Zellen nicht transfiziert werden und waren somit für weitergehende Versuche nicht nutzbar. Die ausgezeichnete Reaktion der anderen Zelllinien auf PDGF-BB war, neben dem von Beginn an bestehenden Interesse am Einfluss der Phosphatasen auf die STW des PDGF β -R, ein weiterer Grund für die nachfolgenden Experimente PDGF-BB als chemotaktischen Lockstoff zu verwenden.

3.4.2. Dep-1, PTP α und PTP1B haben unterschiedliche Effekte auf die PDGF-BB-stimulierte Zellmigration

PAE-X23-, NDW-H3₂-, NDC-F6- und PAE-D19-Zellen sowie PTP1B^{-/-} und PTP1B^{+/+} Zellen wurden in zahlreichen Migrationsversuchen mit einer

3. Ergebnisse

Boyden-Kammer verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen ausgesetzt. Im Vergleich erfolgte die Inkubation mit serumfreiem Medium und Medium mit 10% FCS (Positivkontrolle). Dabei erfolgte die Einsaat der Zellen mit und ohne Phosphatase parallel in jeweils einer Hälfte der Kammer, so dass ein direkter Vergleich der entsprechenden Werte innerhalb eines Experiments möglich war. Für jede Zelllinie sind die berechneten Mittelwerte aus den Vierfachbestimmungen der Zellzahlen für einen ausgewählten Versuch in Abb. 3-9 grafisch dargestellt.

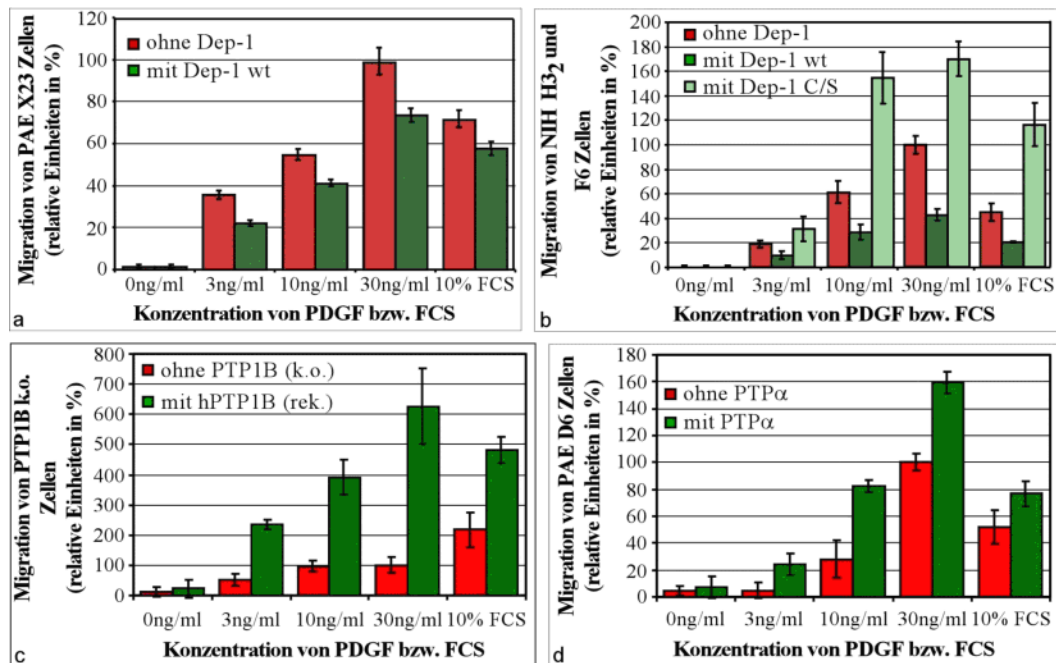


Abb. 3-9: PDGF-stimulierte Migration (a) Migration von PAE-X23-Zellen mit (-ATC, grün) und ohne Dep-1wt-Expression (+ATC, rot) in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch verschiedene Konzentrationen von PDGF, 10% FCS oder unstimuliert. (b) Migration von NDW-H3₂- und NDC-F6-Zellen ohne Dep-1 (+ATC, rot) mit Dep-1wt (-ATC, dunkelgrün) und Dep-1C/S (-ATC, hellgrün) in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch verschiedene Konzentrationen von PDGF, 10% FCS oder unstimuliert. (c) Migration von PTP1B^{-/-} (k.o., rot) und PTP1B^{+/+} (hBTP1B, grün) Zellen in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch verschiedene Konzentrationen von PDGF, 10% FCS oder unstimuliert. (d) Migration von PAE-D19-Zellen ohne (+ATC, rot) und mit PTP α (-ATC, grün)-Expression in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch verschiedene Konzentrationen von PDGF, 10% FCS oder unstimuliert. Nach 4h Inkubation bei 37°C, 5%CO₂ wurden die durch eine Kollagen-beschichtete Polycarbonat-Membran gewanderten Zellen fixiert, gefärbt und die Zellen in einem 4x4 Feld einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Balken sind Mittelwerte der vier parallelen Werte eines Experiments, repräsentativ für 4 unabhängige Versuche. Die Werte sind normiert auf die Zellzahlen bei 30ng/ml PDGF-BB, ohne Phosphatase, die gleich 100% gesetzt wurden. Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen.

Um die Werte für die Fibroblasten mit induzierbarer Expression von Dep-1wt bzw. Dep-1C/S in einem Diagramm zeigen zu können (Abb. 3-9b), wurden die Intensitäten ohne PTP-Expression (+ATC) der einander entsprechenden Stimuli gleich gesetzt und die Intensitätswerte für die NDC-F6-Zellen ohne ATC neu berechnet. Dies erfolgte in der Annahme, dass die NIH3T3-Zellen mit ausgeschalteter Phosphatase

3. Ergebnisse

dasselbe Wanderungsverhalten zeigen und sich nur in den Absolutwerten zwischen den einzelnen Experimenten unterscheiden. Die Relation zu den Intensitäten unter Einfluss von Dep-1wt bzw. Dep-1C/S bleibt nach der Neuberechnung erhalten, und die qualitative Aussage über den Effekt von Dep-1 auf die Zellwanderung ist auch weiterhin möglich. Wie die X23-Zellen in Abb. 3-9a zeigen auch die NDW-H₂-Zellen (Abb. 3-9b) eine deutlich reduzierte Migration, während die Expression der Dep-1C/S-Mutante die Zahl der gewanderten Zellen deutlich erhöht. Vermutlich wird dieser Effekt durch eine dominant negative Wirkung auf endogen vorhandene Dep-1 verursacht. Zusammenfassend kann daher gesagt werden, daß Dep-1 einen hemmenden Einfluss auf die Zellmigration ausübt, der dabei allerdings nicht nur auf die PDGF-BB-stimulierte Migration beschränkt ist. Auch ohne den Wachstumsfaktor und bei Stimulation mit 10% FCS können ähnliche Auswirkungen des Wildtyps und der C/S-Mutante auf die Zahl der gewanderten Zellen beobachtet werden. Für die PAE-X23-Zellen konnte der hemmende Effekt von Dep-1wt auf die PDGF-BB stimulierte Migration in mehr als 8 Experimenten nachgewiesen werden. Die entsprechenden Durchschnittswerte sind in Tabelle 3-I zusammengefasst ($p < 0,002$ für alle Konzentrationen).

PDGF-BB-Konzentration	3ng/ml	10ng/ml	30ng/ml
Migration reduziert auf (% Migration mit Dep-1 zu Migration ohne Dep-1)	44,8% \pm 18,1%	70,9% \pm 15,5%	72,5% \pm 16,2%

Tabelle 3-I: Durchschnittliche Hemmung der Migration von PAE-X23-Zellen durch Dep-1wt

Ein gegenteiliges Verhalten zeigen die PTP α -exprimierenden PAE-D19-Zellen in Abb. 3-9c. Hier ist die Migration bei Anwesenheit der Phosphatase (-ATC) gegenüber den Zellen mit abgeschalteter PTP (+ATC) stark erhöht. Das gilt ebenfalls sowohl für die nicht stimulierte Migration (0ng/ml PDGF) als auch für Werte unter Einfluss von PDGF-BB oder FCS. PTP α begünstigt also anscheinend die Zellwanderung.

Im Vergleich der PTP1B^{-/-} und PTP1B^{+/+} Zellen (Abb.3-9d) ist bei letzteren auf den ersten Blick die Zahl der gewanderten Zellen deutlich höher, sowohl unstimuliert als auch mit PDGF-BB oder FCS. Allerdings geben Beobachtungen während der Fixierung und Färbung der Zellen eher Grund zu der Vermutung, dass in Abwesenheit der Phosphatase die Migration der Zellen nur scheinbar vermindert ist. Die

verringerte Zellzahl auf der Unterseite der Polycarbonat-Membran ist vielmehr der sekundäre Effekt einer drastisch gestörten Adhäsion (siehe 3.5.). Die PTP1B^{-/-} Zellen hafteten bereits auf der Oberseite der Polycarbonat-Membran im Zeitraum eines Migrationsversuches nur sehr schlecht an, und nicht adhärierte Zellen können nachfolgend auch nicht durch die Membran wandern. Weiterhin reduziert die verschlechterte Adhäsion auf der Unterseite der Membran zusätzlich die Zahl nachweisbarer Zellen. Insgesamt überlagern diese Vorgänge möglicherweise einen Effekt der Phosphatase auf die Zellwanderung, weshalb innerhalb dieser Arbeit nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob PTP1B tatsächlich einen Einfluss direkt auf die Migration hat oder diese weitestgehend unverändert läßt.

3.4.3. Einfluss der Inhibitoren D-65495, SU6656 und Wortmannin auf die PDGF-stimulierte Zellmigration

Nach den bisherigen Ergebnissen sind die Phosphatasen Dep-1 und PTP α in der Lage, die PDGF-BB-stimulierte Migration zu modulieren. Dies könnte durch direkte Effekte der PTP auf die PDGF β -R-Phosphorylierung oder "stromabwärts" auf Mediatoren der Signaltransduktion erfolgen. Versuche mit verschiedenen Inhibitoren sollten zeigen, ob Dep-1 solche oder andere Angriffspunkte hat. Dazu wurde die Migration in Gegenwart des PDGF β -R-Inhibitors D-65495, des Src-Kinasen-Inhibitors SU6656 und des PI3-Kinase Inhibitors Wortmannin untersucht. In Abb. 3-10 sind die Ergebnisse einiger entsprechender Versuche mit den PAE-X23-Zellen grafisch dargestellt.

3. Ergebnisse

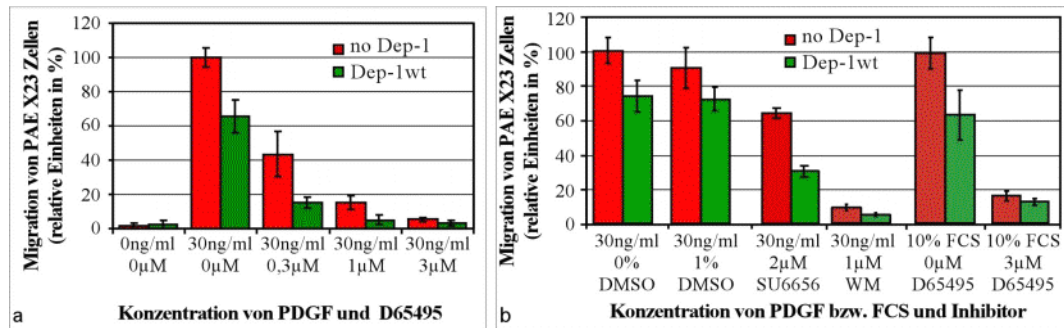


Abb. 3-10: Einfluss der Inhibitoren D-65495, SU6656 und Wortmannin (WM) auf die PDGF-BB- und FCS-stimulierte Migration von PAE-X23-Zellen (a) Migration von PAE-X23-Zellen mit (-ATC, grün) und ohne Dep-1wt-Expression (+ATC, rot) in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch 30ng/ml PDGF oder unstimuliert bei verschiedenen Konzentrationen des PDGFβ-R-Inhibitors D-65495. Die erste Zahl der X-Achsen-Beschriftung gibt die PDGF-Konzentration an, die zweite Zahl die des Inhibitors. (b) Migration von PAE-X23-Zellen mit (-ATC, grün) und ohne Dep-1wt-Expression (+ATC, rot) in einer Boyden-Kammer, stimuliert durch 30ng/ml PDGF, 10% FCS oder unstimuliert bei Zugabe von 1% DMSO (Lösungsmittelkontrolle), 2μM SU6656 (Src-Kinasen-Inhibitor), 1μM WM (PI3-Kinasen-Inhibitor) oder 3μM D-65495. Die erste Zahl der X-Achsen-Beschriftung gibt die PDGF- bzw. FCS-Konzentration an, die zweite Zahl die des Inhibitors.

Nach 4h Inkubation mit bzw. ohne Inhibitor bei 37°C, 5% CO₂ wurden die durch eine Kollagen-beschichtete Polycarbonat-Membran gewanderten Zellen fixiert, gefärbt und die Zellen in einem 4x4 Feld einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Balken sind Mittelwerte der vier parallelen Werte eines Experiments, repräsentativ für 3 unabhängige Versuche. Die Werte sind normiert auf die Zellzahlen bei 30ng/ml PDGF-BB bzw. 10% FCS, ohne Phosphatase und ohne Inhibitor, die gleich 100% gesetzt wurden. Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen.

Der Inhibitor wurde der Zellsuspension im oberen Teil der Kammer zugesetzt und für die Dauer des gesamten Versuches mit den Zellen inkubiert. Dabei wurde zum einen bei einem Stimulus von 30ng/ml PDGF die Konzentration des D-65495 variiert (Abb. 3-10). Zum anderen wurden die PAE-Zellen mit 30ng/ml PDGF-BB oder 10% FCS stimuliert und die Wirkung verschiedener Inhibitoren getestet. Die Inkubation mit 1% DMSO diente als Kontrolle für einen möglichen Effekt des Lösungsmittels auf die Migration, der aber ausgeschlossen werden konnte. Sowohl bei Stimulation der Zellen mit PDGF als auch mit FCS verursachte die Blockierung des PDGFβ-R eine stark reduzierte Migration der Zellen. Die Wirkung von D-65495 ist hierbei dosisabhängig (Abb. 3-10a). Bei einer ausreichend hohen Konzentration des Inhibitors konnte die Zellmigration fast bis auf das Niveau der unstimulierten Zellen reduziert werden, wobei auch kaum noch Unterschiede zwischen den Phosphatase-exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen zu beobachten waren. Der negative Effekt von Dep-1 auf die restliche noch stattfindende Zellmigration konnte durch den Inhibitor allerdings nicht vollständig aufgehoben werden. Das gleiche Ergebnis ergaben die Versuche mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin und dem Src-Kinase-Inhibitor SU6656. Wie in Abb. 3-10b gezeigt, wandern die Zellen mit den Inhibitoren deutlich weniger, besonders

durch das Blocken der PI3-Kinasen wird die Migration effektiv gehemmt. Die verbleibende Migration unterliegt weiterhin der negativen Modulation durch Dep-1. SU6656 hat dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Zellwanderung. Die verminderten Zellzahlen werden hier vermutlich durch Störung der Adhäsion nach Hemmung der Src-Kinasen (siehe 3.5.) verursacht. Anscheinend ist Src nicht an der Signalübertragung für die PDGF-stimulierte Migration beteiligt. Insgesamt lassen die Experimente damit zwar den Schluss zu, dass wie erwartet der PDGF β -R und möglicherweise die PI3-Kinasen essentiell für die Wanderung der Zellen innerhalb des verwendeten Versuchssystems sind. Dep-1 hat jedoch in allen Fällen einen zusätzlichen Effekt, was am besten mit der Annahme in Einklang steht, dass Dep-1 an mehreren Stellen in die zur Migration führende Signaltransduktion eingreift (siehe Diskussion).

3.5. Dep-1 und PTP1B steigern die Zell-Matrix-Adhäsion

In den Versuchen mit den PTP1B k.o.-Zellen wurde besonders deutlich, daß Zellwanderung und Zell-Matrix-Adhäsion zwei eng miteinander verknüpfte zelluläre Vorgänge sind. Zellen können sich auf einer Oberfläche nur bewegen, wenn Bildung und Auflösung der fokalen Adhäsionspunkte räumlich und zeitlich im richtigen Maß erfolgt und gesteuert wird. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der Phosphatasen auf den zeitlichen Verlauf der Adhäsion der Zellen an eine extrazelluläre Matrix untersucht werden. Da für die Rolle von PTP α bei der Zelladhäsion bereits umfangreiche Daten in der Literatur zu finden sind, wurden die Experimente analog Abschnitt 2.11. nur für die Zellen mit bzw. ohne PTP1B- und Dep-1-Expression durchgeführt. Die grafische Darstellung jeweils eines Beispielversuches für die Zelllinien PAE-X23, NDW-H3₂, NDC-F6, sowie PTP1B^{-/-} und PTP1B^{+/+} ist in Abb. 3-11 gezeigt.

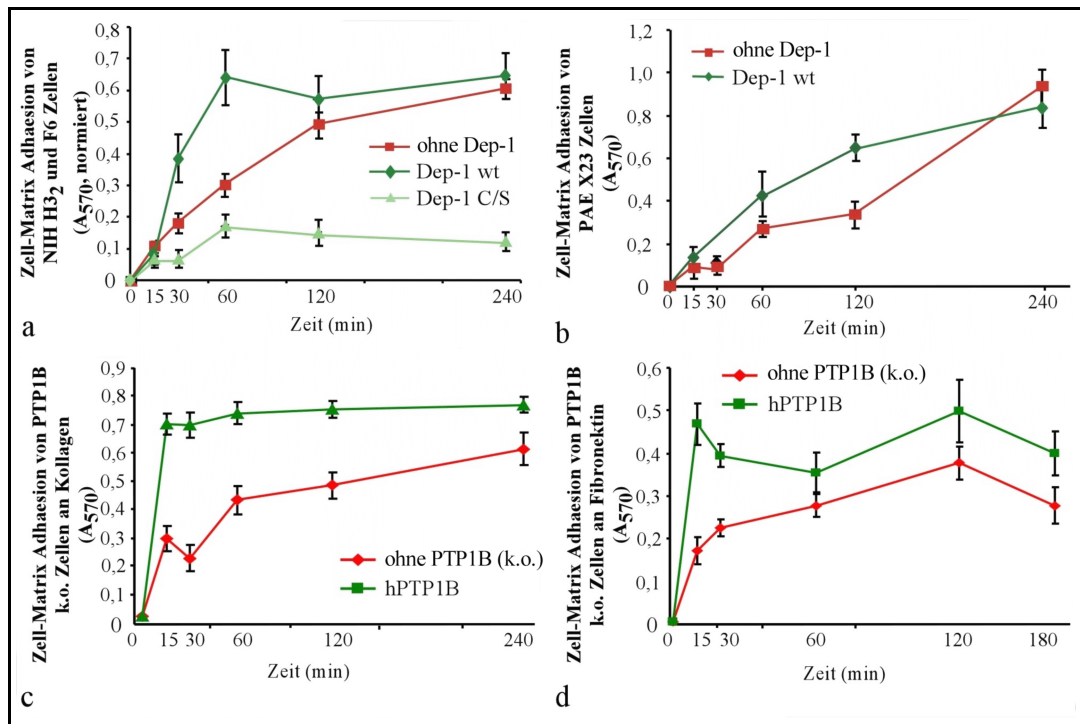


Abb. 3-11: Einfluss der PTP Dep-1 und PTP1B auf die zeitabhängige Zell-Matrix-Adhäsion (a) Adhäsion von NDW-H3₂- und NDC-F6-Zellen ohne Dep-1 (+ATC, rot) mit Dep-1wt (-ATC, dunkelgrün) und Dep-1C/S (-ATC, hellgrün) an eine mit Kollagen beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 240min. (b) Adhäsion von PAE-X23-Zellen mit (-ATC, grün) und ohne Dep-1wt-Expression (+ATC, rot) an eine mit Kollagen beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 240min. (c) Adhäsion von PTP1B^{-/-} (k.o., rot) und PTP1B^{+/+} (hBTP1B, grün) an eine mit Kollagen beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 240min. (d) Adhäsion von PTP1B^{-/-} (k.o., rot) und PTP1B^{+/+} (hBTP1B, grün) an eine mit Fibronektin beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 180min.

3x 10⁴ Zellen in Hungermedium + 2,5mg/ml BSA wurden pro Loch in 96-Lochplatten eingesät (8-fach-Bestimmung eines Messpunktes). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellsuspension abgesaugt und wurden die adhärenierten Zellen fixiert, gefärbt, gewaschen und in Natriumcitrat resuspendiert. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus den 8-fach parallel bestimmten Absorptionen bei 570nm von einem Versuch, repräsentativ für vier Experimente. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichungen.

Für die NIH3T3 Linien mit Dep-1wt (NDW-H3₂)- und Dep-1C/S (NDC-F6)-Expression wurden die Absorptionswerte derselben Zeitpunkte für die Zellen ohne Phosphatase wieder gleich gesetzt und die -ATC-Werte für die NDC-F6-Zellen neu berechnet, um Wildtyp und Mutante in einem Diagramm vergleichen zu können (Abb. 3-11a). Ebenso wie bei den PAE-X23-Zellen (Abb. 3-11b) adhären die Zellen mit Wildtyp-Dep-1 schneller an die Kollagen-Matrix als die Zellen ohne Phosphatase. Nach 4 Stunden ist die Zahl der angehefteten Zellen aber ungefähr gleich. Im Gegensatz dazu erfolgt die Adhäsion der NDC-F6-Zellen mit "eingeschalteter" Expression der Mutante sehr viel langsamer als bei den Zellen ohne PTP oder gar mit Wildtyp-PTP und erreicht auch nach 4 Stunden nicht den gleichen Maximalwert. Im Vergleich zum Effekt von Dep-1 sind die Unterschiede in der Zell-Matrix-Adhäsion zwischen den PTP1B^{-/-} und

3. Ergebnisse

PTP1B^{+/+} Linien noch deutlicher (Abb. 3-11c und 3-11d). Während bei der mit PTP1B rekonstituierten Linie bereits nach 15-30 min die maximal messbare Anzahl angehefteter Zellen erreicht ist, liegen die Werte für die k.o.-Zellen zu diesem Zeitpunkt teilweise mehr als 50% niedriger und erreichen erst nach 3 bis 4 Stunden ein ähnlich hohes Maximum. Die durchgeführten Experimente zeigen eindeutig, daß sowohl Dep-1 als auch PTP1B einen fördernden Einfluss auf die Zell-Matrix-Adhäsion haben. Der Effekt der PTP ist dabei anscheinend weitest gehend unabhängig von der verwendeten Matrix, da die Adhäsion der PTP1B^{-/-} und PTP1B^{+/+} Zellen an Fibronektin (Abb. 3-11d) oder an die unbeschichteten 96-Loch-Platten (Daten nicht gezeigt) ebenso wie bei Kollagen verläuft. Auch Stimulation der Zellen während der Versuche mit PDGF-BB oder FCS (Daten nicht gezeigt) beschleunigt die Zell-Matrix-Adhäsion zwar insgesamt, die qualitativen Unterschiede zwischen Phosphatase-exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen ändern sich jedoch nicht. So ist es beispielsweise ebenfalls ohne Bedeutung, ob die Zellen vor dem Versuch gehungert oder in normalem Wachstumsmedium kultiviert wurden. Die Adhäsion entsprechend behandelter PTP1B^{-/-} bzw. PTP1B^{+/+} Zellen zeigt keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3-12). Die Zell-Matrix-Adhäsion wird demnach durch Dep-1 und PTP1B unabhängig von PDGF β -R Signalwegen moduliert.

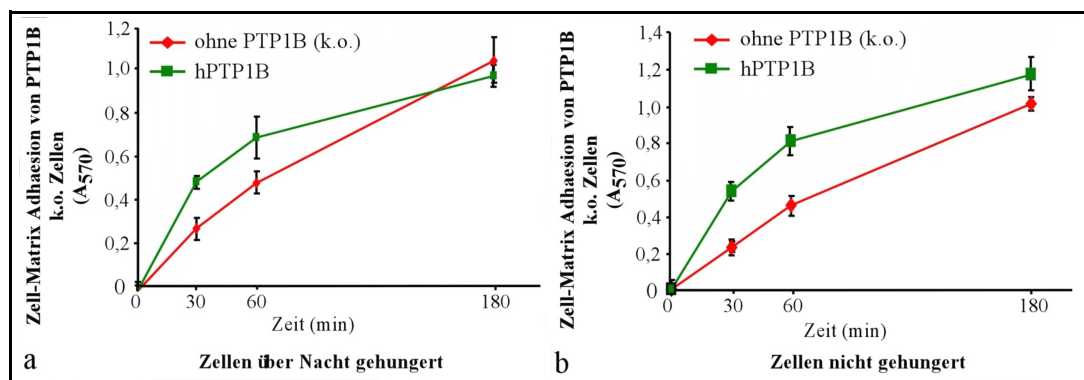


Abb. 3-12: Einfluss von PTP1B auf die Zell-Matrix-Adhäsion Serum-depletierter und nicht Serum-depletierter Zellen (a) Adhäsion von PTP1B^{-/-} (k.o., rot) und PTP1B^{+/+} (hBTP1B, grün) an eine mit Kollagen-beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 180min. Nachdem die Zellen über Nacht ohne Serum kultiviert wurden. (d) Adhäsion von PTP1B^{-/-} (k.o., rot) und PTP1B^{+/+} (hBTP1B, grün) an eine mit Kollagen beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 180min, Zellen in normalem Serum mit 10% FCS kultiviert. Versuch erfolgte analog zu 3-11, die Werte entsprechen den Mittelwerten aus den 8-fach parallel bestimmten Absorptionen bei 570nm von einem Versuch, repräsentativ für zwei Experimente. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichungen.

Aufgrund der in der Literatur viel diskutierten Rolle der Src-Kinasen für die Zell-Matrix-Adhäsion sollte auch der Einfluss des Src-Kinase-Inhibitors SU6656 auf die

3. Ergebnisse

Adhäsion und im speziellen auf den Effekt von Dep-1 in diesem Zusammenhang untersucht werden. Stellvertretend ist für die Linien PAE-X23, NDW-H3₂ und NDC-F6 jeweils ein Experiment in Abb. 3-13 grafisch dargestellt.

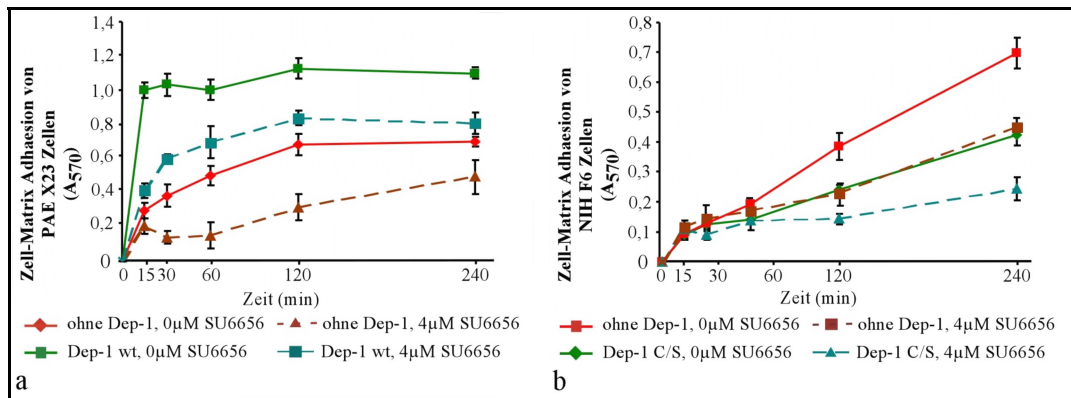


Abb. 3-13: Einfluss des Src-Kinase-Inhibitors SU6656 auf die Zell-Matrix-Adhäsion (a) Adhäsion von PAE-X23-Zellen mit (-ATC, grün) und ohne Dep-1wt-Expression (+ATC, rot) an eine mit Kollagen beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 240min. Die Zellen wurden dabei mit 4µM SU6656 oder ohne Inhibitor inkubiert wie angegeben. (b) Adhäsion von NDC-F6-Zellen ohne Dep-1 (+ATC, rot) und mit Dep-1C/S (-ATC, grün) an eine mit Kollagen beschichtete 96-Lochplatte über einen Zeitraum von 240min. Die Zellen wurden dabei mit 4µM SU6656 oder ohne Inhibitor inkubiert wie angegeben. Versuchsablauf ist analog 3-11, die Werte entsprechen den Mittelwerten aus den 8-fach parallel bestimmten Absorptionen bei 570nm von einem Versuch, repräsentativ für vier Experimente. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichungen.

Auch bei einer Konzentration von 4µM SU6656 für die gesamte Dauer des Versuchs ist eine Hemmung der Adhäsion zwar sichtbar, aber doch nur sehr schwach. Desweiteren bleibt auch der Effekt von Dep-1 wt bzw. Dep-1 C/S auf die Adhäsion erhalten und kann nicht durch eine Hemmung von Src beeinflusst werden.

3.6. Einfluss der Phosphatasen auf die Signaltransduktion des PDGFb-R

Dep-1, PTPα und möglicherweise auch PTP1B können regulatorisch in die PDGF-BB-stimulierte Migration eingreifen. Es sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss diese PTP auf die verschiedenen STW des PDGFβ-R haben und inwieweit sich daraus die beobachteten zellulären Effekte erklären lassen.

3.6.1. Regulation der Ras-Aktivität

Die MAPK-Kaskade kann durch verschiedene STW aktiviert werden. Der Weg ausgehend vom PDGFβ-R verläuft dabei über die Aktivierung der kleinen GTPase Ras. Deshalb sollte durch Ras-Pulldown-Experimente (siehe Abschnitt 2.13.) zunächst untersucht werden, ob ein Effekt der Phosphatasen auf die Ras-GTPasen zu beobachten ist. Nach Stimulation der Zellen mit 50ng/ml PDGF kann aktives Ras aus den Lysaten

3. Ergebnisse

durch die Ras-Bindedomäne des Raf-Proteins spezifisch präzipitiert und anschließend mittels SDS-PAGE und anti-Ras-Immunblot nachgewiesen werden. In Abb. 3-14 ist jeweils der Blot eines Versuches mit den Zelllinien PAE-X23 (Dep-1wt) und PAE-D6 (PTP α) gezeigt.

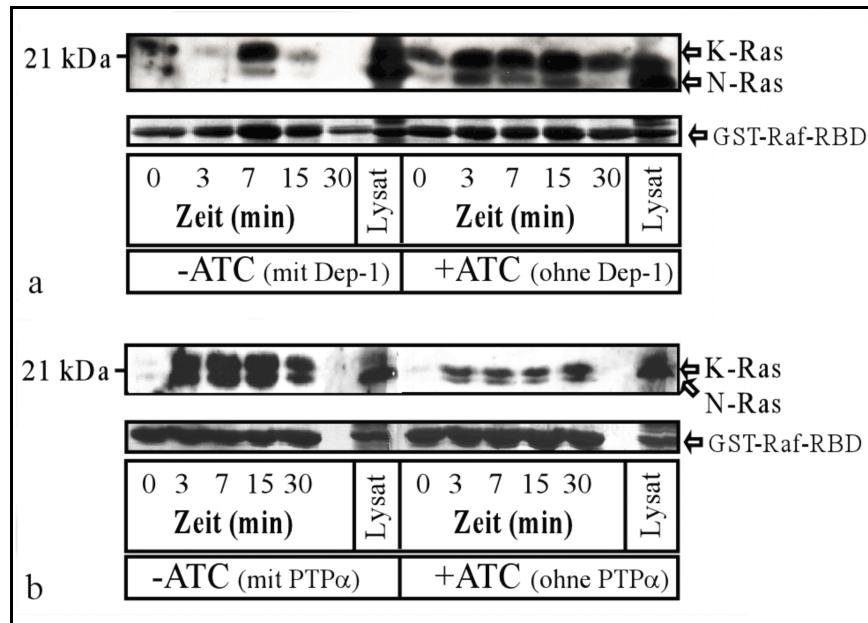


Abb. 3-14: Einfluss der PTP auf die PDGF-BB-stimulierte Ras-Aktivierung (a) Aktivierung von Ki-Ras und N-Ras in PDGF-stimulierten PAE-X23-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) Dep-1wt-Expression (b) Aktivierung von Ki-Ras und N-Ras in PDGF-stimulierten PAE-D6-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) PTP α -Expression

Die Zellen wurden in 6-Loch-Schalen eingesät, in den entsprechenden Fällen mit und ohne ATC bis zur Konfluenz kultiviert, über Nacht serumfrei gesetzt und danach für die angegebenen Zeiten mit 50ng/ml PDGF stimuliert. Aktives Ras wurde aus den Lysaten mittels Raf-RBD-GST präzipitiert und durch SDS-PAGE und anti-Ras-Immunblot visualisiert. GST-Raf-RBD wurde im PAA-Gel mit Coomassie gefärbt. Das gezeigte Bild ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Obwohl die PAE-X23-Zellen ohne Dep-1-Expression (Abb. 3-14a, +ATC) teilweise bereits in unstimuliertem Zustand einen hohen Spiegel an konstitutiv aktivem Ras aufwiesen, konnte bereits nach dreiminütiger Stimulation mit PDGF-BB eine deutliche Zunahme der Ras-Aktivität beobachtet werden, zwischen 7 und 15 min wurde die maximale Menge an aktivem Ras erreicht, und selbst nach 30 min war das Ras-Signal verglichen mit dem unstimulierten Zustand noch erhöht. In den PAE-X23-Zellen mit Dep-1wt (Abb. 3-14a, -ATC) dagegen war nicht nur die basale Ras-Aktivität deutlich niedriger, auch die Stimulation von Ras nach Zugabe des PDGF war drastisch reduziert. Bei ca. 7 min wurde zwar ebenfalls die höchste Ras-Aktivierung erreicht, aber bereits nach 15 min war das Signal wieder fast völlig abgeschaltet. Dep-1 hemmt offenbar die Aktivierung von Ras durch den PDGF β -R.

Im Falle der PTP α -exprimierenden PAE-D6-Zellen (Abb. 3-13b, -ATC) konnte im Gegensatz dazu sogar ein höherer Spiegel an aktivem Ras nach PDGF-BB Stimulation nachgewiesen werden. Dabei war kein Anstieg des konstitutiv aktiven Ras zu verzeichnen, dafür aber ein veränderter zeitlicher Verlauf der Stimulation. So wurde der Höchstwert bereits bei 3 min erreicht und nach 15 min war das Signal wieder deutlich abgeschwächt. PTP α erhöht also die PDGF-stimulierte Ras-Aktivierung.

Dep-1 und PTP α spielen damit verschiedene Rollen bei der Stimulation der Ras-GTPasen durch PDGF. Während Dep-1 die Ras Aktivierung negativ beeinflusst, wirkt sich die Expression von PTP α fördernd darauf aus.

3.6.2. Regulation der Erk/ Akt-Aktivität

Die MAPK-Kaskade ist ein wichtiger Signalweg bei vielen biologischen Prozessen und hauptsächlich an der Übertragung mitogener Stimuli beteiligt (siehe Abschnitt 1.2.1.3. ERK/ MAPK-Kaskade). Da die Proliferationsversuche nur unbefriedigende Resultate erbrachten und ein deutlicher Einfluss der PTP auf die Ras-Aktivierung beobachtet werden konnte, war es interessant, in welchem Maße Erk durch Stimulation der Zellen mit PDGF-BB aktiviert werden kann und welchen Effekt die Expression der Phosphatasen darauf hat. Die Aktivität von Erk ist von der Phosphorylierung an Thr und Tyr abhängig und kann deshalb mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunblot mit einem phosphospezifischen Antikörper indirekt bestimmt werden. Der Nachweis des gesamten Erk als Kontrolle für die Verwendung gleicher Proteinmengen erfolgt mit einem Antikörper, der die verschiedenen Erk-Isoformen unabhängig von ihrer Phosphorylierung erkennt. Die Versuche wurden wie unter Abschnitt 2.9. beschrieben durchgeführt und Abb. 3-15 zeigt die entsprechenden Immunblots je eines repräsentativen Experiments mit den Linien PAE-X23 (Abb. 3-15a), NDW-H3₂ (Abb. 3-15b), NDC-F6 (Abb. 3-15c) sowie PAE-D6 (Abb. 3-15d). Als Kontrolle für einen möglichen Effekt des ATC auf die MAPK ist in Abb. 3-15e ein Experiment mit PAE-ZnR5-Zellen gezeigt, die nicht mit einer Phosphatase transfiziert sind.

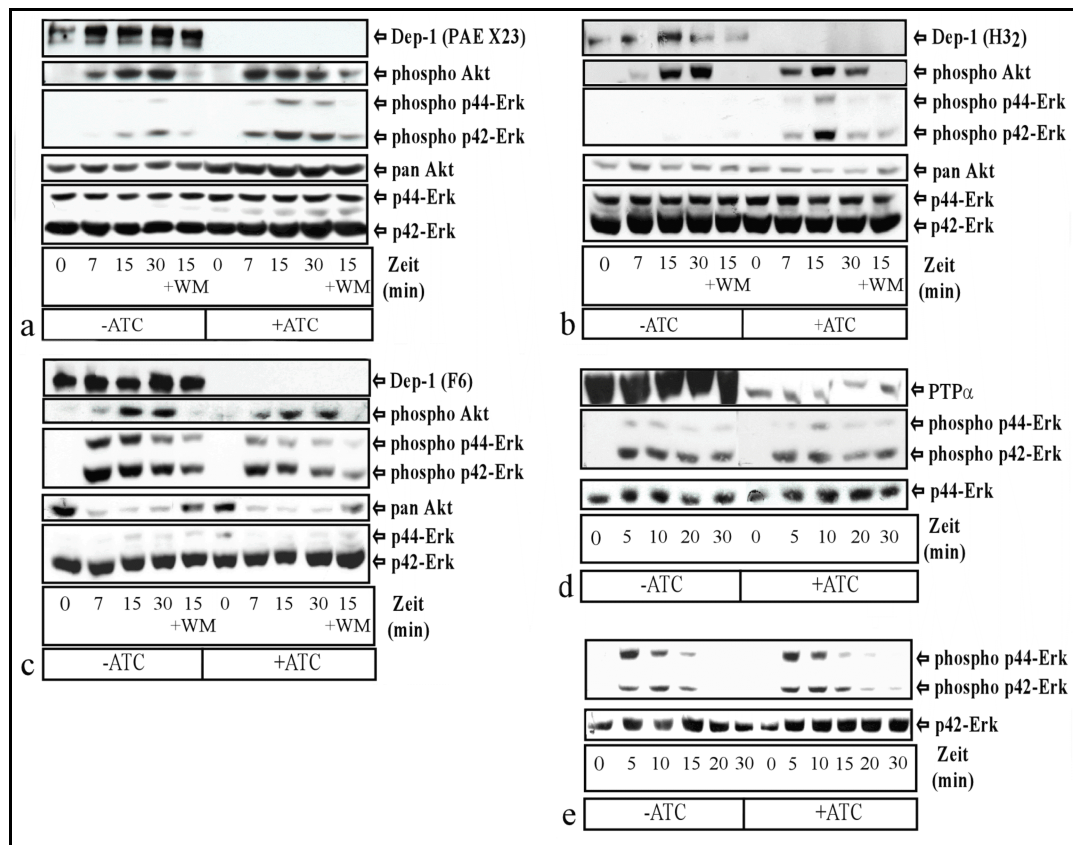


Abb. 3-15: Einfluss der PTP auf die PDGF stimulierte Aktivierung von Erk und Akt (a) Aktivierung von Akt und Erk in PAE-X23-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) Dep-1wt-Expression (b) Aktivierung von Akt und Erk in NDW-H3₂-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) Dep-1wt-Expression (c) Aktivierung von Akt und Erk in NDC-F6-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) Dep-1C/S-Expression (d) Aktivierung von Erk in PAE-D6-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) PTP α -Expression (e) Aktivierung von Erk in PAE-ZnR5-Zellen, kultiviert mit ATC und ohne ATC

Gleiche Zellzahlen wurden in 6-Loch-Schalen eingesät, mit und ohne ATC bis zur Konfluenz kultiviert, über Nacht gehungert und danach für die angegebenen Zeiten mit 50ng/ml PDGF stimuliert. 10% der Lysate wurden für SDS-PAGE und Immunblot mit anti-Phospho-p42/p44-Erk-, anti-phospho-Akt-, anti-Dep-1- bzw. anti-vsv-Antikörpern (PAE-D6) verwendet. Der Nachweis der Gesamtmengen an Erk und Akt erfolgte durch Strippen der entsprechenden Membranen und Immunblot mit pan-Erk- und pan-Akt-Antikörpern. Die ausgewählten Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Alle Zellen zeigten dabei eine deutliche, zeitabhängige Stimulation der Erk-Aktivität durch PDGF. Im Falle der Dep-1wt-exprimierenden PAE-X23- (3-15a) und NDW-H3₂-Zellen (3-15b) wurde Erk allerdings erheblich langsamer und sehr viel schwächer phosphoryliert als in den Zellen ohne Phosphatase (+ATC) oder gar in den NDC-F6-Zellen (3-15c) mit der Dep-1C/S-Mutante, welche gegenüber den Vergleichszellen eine höhere Erk-Aktivierung aufwiesen. So erreichten die PAE-X23-Zellen mit Dep-1wt erst nach 30min die höchste Erk-Phosphorylierung, während bei den Zellen ohne Phosphatase das Signal bei 30min bereits wieder abgenommen hatte. Der gleiche Effekt kann auch bei der Phosphorylierung und Aktivierung von Akt, einem Effektor der PI3-Kinasen, beobachtet werden, auch wenn

hier die Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne Phosphatase-Expression nicht so deutlich wie bei der MAPK sind. Wie aufgrund des negativen Einflusses auf Ras erwartet, hemmt Dep-1 auch die Stimulation der MAPK und ebenfalls, wenn auch weit schwächer, die von Akt. Interessanterweise blockiert Wortmannin nicht nur die Akt-Aktivierung, sondern in den PAE-Zellen gleichfalls die von Erk.

Einen positiven Effekt hatte hingegen PTP α auf die PDGF-stimulierte Erk-Aktivierung (3-15d). Während ohne die Phosphatase die stärkste Phosphorylierung der MAPK erst nach 10 min Stimulation erreicht wurde, konnte in den Zellen mit PTP α bereits nach 5min die höchste Steigerung der Erk-Phosphorylierung beobachtet werden. Ansonsten ist der zeitliche Verlauf der Erk-Aktivierung bei den Zellen mit und ohne PTP α relativ gleich, und mit der Phosphatase ist nur der Spiegel an phosphoryliertem Erk höher.

Erk ist offensichtlich an der Signaltransduktion des PDGF β -R beteiligt und die Signale vom Rezeptor zur MAPK können im Einklang mit dem Einfluss auf die Ras-Aktivierung durch die Phosphatasen unterschiedlich reguliert werden. Dep-1 verringert in Abhängigkeit von der katalytischen Aktivität die Aktivierung von Erk, während PTP α einen stimulatorischen Effekt hat.

3.6.3. Dep-1 hemmt die PDGF-stimulierte Aktivierung von Src und der PI3-Kinasen

Für Dep-1 sollte im Zellsystem der PAE-X23-Zellen noch näher auf die Frage eingegangen werden, ob die Phosphatase auch weitere PDGF stimulierbare Signalwege modulieren kann. Dies sollte weitere Informationen darüber liefern, über welchen Weg Dep-1 seinen Einfluss auf die Zellmigration ausübt. Aus diesem Grund sollten neben der PDGF-stimulierten Aktivierung der PLC γ (E. Jandt, Diplomarbeit) auch die PI3-Kinasen und Src näher untersucht werden. Dazu wurde aus PDGF-stimulierten PAE-X23-Zellen mit und ohne Dep-1 entweder der PDGF β -R mit assoziierter PI3-Kinase (siehe 2.14.) oder v-Src (siehe 2.15.) durch Immunpräzipitation abgetrennt und die Aktivität der Enzyme in einem *in vitro* Kinase-Assay bestimmt. Eine grafische Darstellung je eines ausgewählten Versuches zeigt Abb. 3-16.

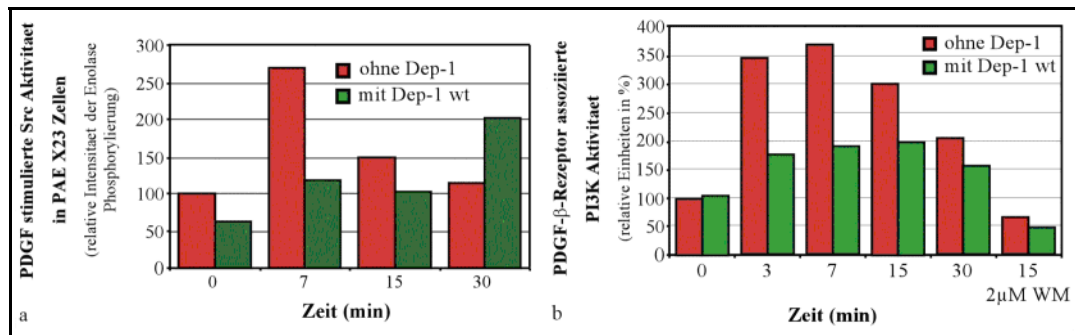


Abb. 3-16: Einfluss von Dep-1 auf die PDGF-stimulierte Aktivierung von Src und der PI3-Kinasen
 (a) *in vitro*-Src-Kinase-Assay mit Src, γ - 32 P-ATP und Enolase als Substrate. v-Src wurde immunpräzipitiert aus PAE-X23-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) Dep-1, stimuliert mit 50ng/ml PDGF-BB für die angegebenen Zeiten. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt, und die radioaktive Phosphorylierung der Enolase wurde densitometrisch nach Exposition in einem PhosphoImager bestimmt. Die Balken geben die Intensitätswerte der Radioaktivität in % an, bezogen auf den Wert der unstimulierten Zellen ohne Dep-1, der gleich 100% gesetzt wurde. (b) *in vitro*-PI3-Kinase-Assay mit PDGF β -R assoziierter PI3-Kinase, γ - 32 P-ATP und PI (Phosphatidyl-Inositol) als Substrate. PDGF β -R wurde immunpräzipitiert aus PAE-X23-Zellen mit (-ATC) und ohne (+ATC) Dep-1, stimuliert mit 50ng/ml PDGF-BB für die angegebenen Zeiten. Die Lipide wurden anschließend durch Phenol/Chloroform extrahiert, durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, und die radioaktive Phosphorylierung von PIP $_3$ wurde densitometrisch nach Exposition in einem PhosphoImager bestimmt. Die Balken geben die Intensitätswerte der Radioaktivität in % an, bezogen auf den Wert der unstimulierten Zellen ohne Dep-1, der gleich 100% gesetzt wurde.

Sowohl bei Src als auch bei der PI3-Kinase kommt es in den Zellen ohne Dep-1 (+ATC) zu einer sehr raschen Stimulation der Aktivität durch PDGF, die nach ca. 7min ihren Höhepunkt erreicht und danach wieder zurückgeht. Zwar kann auch in den Zellen mit Dep-1wt (-ATC) eine Zunahme beider Kinase-Aktivitäten beobachtet werden, doch ist die Stimulation geringer und verläuft auch sehr viel langsamer. So konnte bei Src erst nach 30min ein deutlicher Anstieg der Aktivität gemessen werden. Dep-1 wirkt also auch auf die PDGF-abhängige Aktivierung von Src und der PI3-Kinasen negativ regulierend.

3.7. Dep-1 beeinflusst die Adhäsions-abhängige Aktivierung von Src

Src-Kinasen spielen nicht nur in der Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors sondern auch für die Funktion der fokalen Adhäsionskomplexe eine wichtige Rolle. Vor allem in Bezug auf die Zell-Matrix-Adhäsion scheint die Src-Aktivität unbedingt notwendig zu sein. Für einige PTP wurde ein positiver Effekt auf die Zell-Matrix-Adhäsion mittels der Aktivierung von Src beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.1.). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die gesteigerte Adhäsion der Dep-1-exprimierenden Zellen (Abschnitt 3.5.) ebenfalls mit einer veränderten Src-Aktivität einher geht. Dazu wurden wie unter 2.12. beschrieben die gleichen Zahlen

3. Ergebnisse

von PAE-X23-, NDW-H3₂- oder NDC-F6 Zellen (jeweils +/- ATC) für 30min in Suspension gehalten, in 30 mm Schalen eingesät und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Anschließend wurde Src immunpräzipitiert und für einen *in vitro*-Kinase-Assay verwendet. Die grafische Darstellung der vermessenen Autoradiogramme von jeweils einem Experiment mit den verschiedenen Zelllinien zeigt Abb. 3-17. Dabei wurden die Werte für äquivalente Zeitpunkte der mit ATC kultivierten Zellen (keine Dep-1-Expression) wieder gleich gesetzt und die zugehörigen - ATC-Werte für die Linien NDW-H3₂ und NDC-F6 neu berechnet, um alle Zellen in einem Diagramm miteinander vergleichen zu können. Die relativen Verhältnisse wurden nicht geändert.

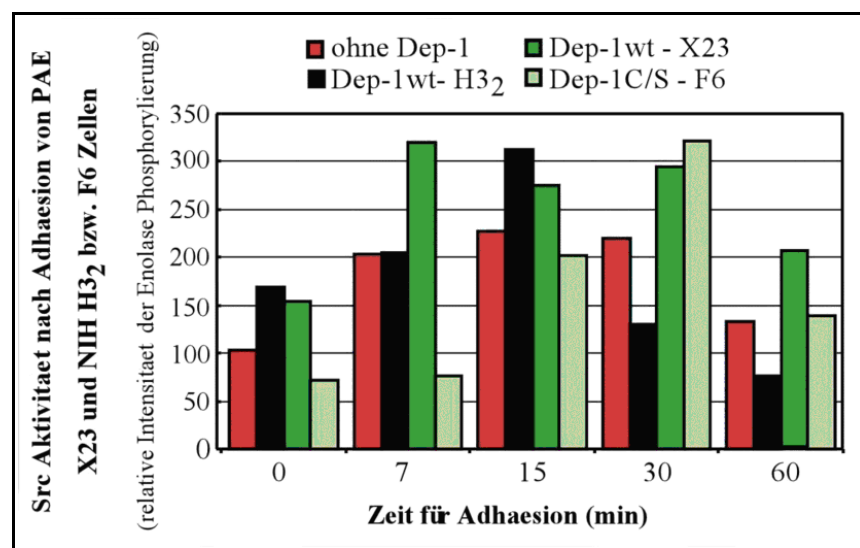


Abb. 3-17: Einfluss von Dep-1 auf die Adhäsions-stimulierte Aktivierung von Src *in vitro* Src-Kinase-Assay mit Src, γ -³²P-ATP und Enolase als Substrate. PAE-X23-Zellen ohne (+ATC, rot) und mit Dep-1wt (-ATC, dunkelgrün), sowie NDW-H3₂-Zellen mit Dep-1wt (-ATC, schwarz) und NDC-F6-Zellen mit Dep-1C/S (-ATC, hellgrün) wurden nach Trypsinierung und 30min in Suspension in 30mm-Schalen eingesät. Die Adhäsion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Lyse der Zellen gestoppt und anschließend v-Src immunpräzipitiert. Nach der Kinase-Reaktion wurden die Proteine durch SDS-Page getrennt und die radioaktive Phosphorylierung der Enolase wurde densitometrisch nach Exposition in einem PhosphoImager bestimmt. Die Balken geben die Intensitätswerte der Radioaktivität in % an, bezogen auf den Wert der unstimulierten Zellen ohne Dep-1, der gleich 100% gesetzt wurde.

In den Experimenten konnte für alle Zellen eine eindeutige Stimulation der Src-Aktivität durch die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche der Kulturschalen beobachtet werden. In den Dep-1wt-exprimierenden Zellen wurde Src aber sehr viel schneller als in den Zellen ohne Dep-1 aktiviert, während Dep-1C/S die Aktivierung drastisch verzögerte. Anscheinend beschleunigt Dep-1 die Aktivierung von Src, allerdings erreichen dabei die Zellen mit Dep-1wt und Dep-1C/S-Mutante die gleiche maximale Substratumsatzrate der Kinase. Nur der Zeitpunkt der maximalen Src-Aktivität, verschiebt sich von 7min (PAE-X23) bzw. 15min (NDW-H3₂) in den

3. Ergebnisse

Zellen mit Dep-1wt zu 15min in den Zellen ohne Dep-1 und schließlich zu 30min bei der Dep-1C/S-Mutante. Die Aktivierung von Src durch Adhäsion scheint auch vom Zelltyp abhängig zu sein. Während in den PAE-X23-Zellen mit Dep-1wt Src sehr schnell aktiviert wird und für wenigstens 30min eine gleichbleibende Aktivität aufweist, wird in den NDW-H3₂- und NDC-F6-Zellen nur für einen kurzen Zeitraum die maximale katalytische Aktivität erreicht. Möglicherweise sind diese Effekte die Ursache für die Unterschiede in der Adhäsion der Zellen. Um diese Frage eindeutig zu klären, sind jedoch weitere Experimente notwendig.

Mit Hilfe von Antikörpern, welche selektiv bestimmte Tyrosin-Phosphorylierungsorte von Src erkennen, sollte die Frage geklärt werden, ob die Phosphorylierung dreier wichtiger Tyrosine in der Kinase mit der An- oder Abwesenheit von Dep-1 korreliert werden kann. Wie in Kapitel 1.2.1.1. beschrieben, ist die Phosphorylierung von Tyr²¹⁵ und Tyr⁴¹⁸ mit einer Aktivierung, Phosphorylierung von Tyr⁵²⁷ (bzw. Tyr⁵²⁹) mit einer Hemmung von c-Src verbunden. Um die Adhäsions- und PTP-abhängige Phosphorylierung dieser Tyrosine zu untersuchen, wurden PAE-X23-Zellen mit und ohne Dep-1 nach 30 min in Suspension in 30 mm-Schalen eingesät und wurde v-Src aus den Lysaten nach erfolgter Adhäsion immunpräzipitiert (siehe auch 2.12.). Die Immunpräzipitate wurden dann mittels SDS-PAGE und anschließend Immunblot mit den verschiedenen anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpern untersucht. Ein entsprechendes Experiment ist in Abb. 3-18 gezeigt.

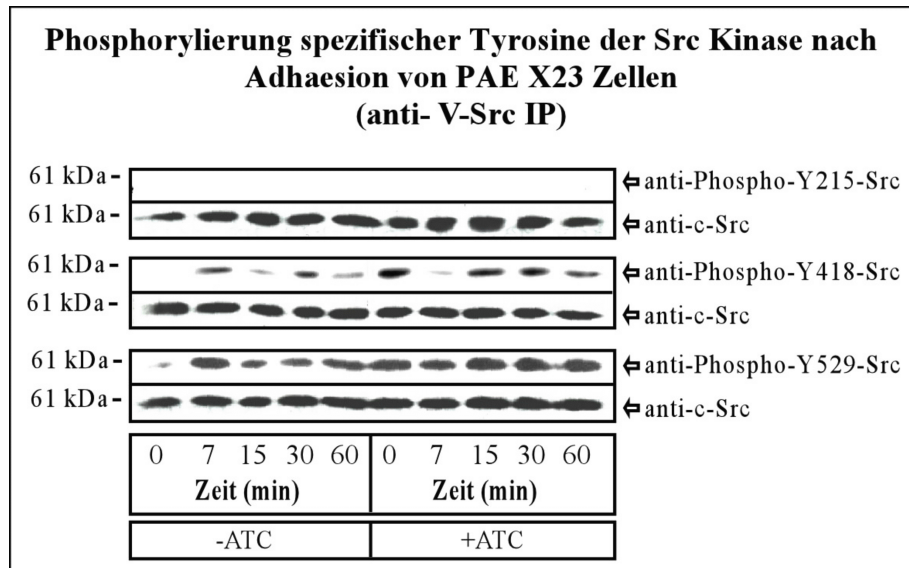


Abb. 3-18: Einfluss von Dep-1 auf die Adhäsions-abhängige Phosphorylierung der Tyrosine 215, 418 und 529 der Src-Kinase PAE-X23-Zellen ohne (+ATC, rot) und mit Dep-1wt (-ATC, dunkelgrün) wurden nach Trypsinierung und 30 min in Suspension in 30 mm Schalen eingesät. Die Adhäsion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Lyse der Zellen gestoppt und anschließend v-Src immunpräzipitiert. Die IP wurden gleichmäßig aufgeteilt, in einem PAA-Gel aufgetrennt und für einen Immunblot mit jeweils einem der Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper verwendet. Für die Darstellung der Gesamtmenge an Src wurden die Membranen gestrippt und einem Reblot mit einem anti-c-Src-Antikörper unterzogen.

Da die Zellen nicht mit PDGF stimuliert worden waren, konnte wie erwartet keine Phosphorylierung des Tyr²¹⁵ beobachtet werden. Die Phosphorylierung der beiden anderen Tyrosine war allerdings nicht so eindeutig zu interpretieren. Zwar ist die Phosphorylierung des inhibitorischen Tyr⁵²⁹ in den Dep-1-exprimierenden Zellen etwas geringer als in den Zellen ohne PTP, doch ist das Tyrosin bei 7min, dem Zeitpunkt mit der höchsten Src-Aktivität, am stärksten phosphoryliert. Aber auch Tyr⁴¹⁸ zeigt bei 7min ein erhöhtes Signal, was eine Aktivierung von Src bedeuten würde. Es ist nicht eindeutig zu beurteilen, welche relativen quantitativen Effekte die im Immunblot darstellbaren Phosphorylierungsspiegel auf die Src-Aktivität haben. Auch mit weiteren solcher Experimente mit den NDW-H3₂- und NDC-F6-Zellen konnte keine eindeutig bevorzugte Phosphorylierung oder Dephosphorylierung eines der Tyrosine bei Anwesenheit der Phosphatase beobachtet und eine klare Korrelation zur Src-Aktivität hergestellt werden.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die verschiedenen Funktionen von Protein-Tyrosin-Phosphatasen für die Signalübertragung des PDGF β -R zu gewinnen. Dabei sollte besonders der Einfluss der PTP Dep-1 auf die PDGF-stimulierte Migration, auf an diesem Vorgang beteiligte Signalproteine und auf die Zell-Matrix-Adhäsion betrachtet werden. Des weiteren war beabsichtigt, vergleichend dazu die Rolle der Phosphatasen PTP1B und PTP α bei den genannten Vorgängen zu untersuchen.

4.1. Zelllinien mit induzierbarer PTP-Expression als Modellsystem

Es standen immortalisierte Zellen aus PTP1B k.o.-Mäusen zur Verfügung, bei denen eine Klon mit humaner PTP1B rekonstituiert worden war. Dadurch war es zwar möglich zwei Zelllinien miteinander zu vergleichen, die in Bezug auf die PTP1B-Expression einen "Ja-Nein" Zustand aufwiesen, bei denen aber Unterschiede im übrigen zellulären Hintergrund durch die Selektion der Klone nicht ausgeschlossen werden konnten. Außerdem wurden die Zellen mit dem T-Antigen des SV40-Virus immortalisiert, was sich teilweise als ungünstig für die Untersuchung von Signalprozessen erwiesen hat und möglicherweise auch die Funktion von PTP1B beeinflusst.

Für die Untersuchung von Dep-1 und PTP α wurde ein Zellsystem gewählt, bei dem die Expression der Phosphatase im selben Klon reguliert werden konnte. Die Expression der verschiedenen Phosphatasen durch An- oder Abwesenheit von Anhydrotetrazyklin im Kulturmedium "ab- oder angeschaltet" werden. Wurde dem Medium ATC zugesetzt, konnten nach etwa zwei Tagen nur noch geringe Mengen der PTP nachgewiesen werden. Das ermöglichte die Verwendung ein und des selben Klones parallel im gleichen Experiment. Allerdings stellen die PAE-Zelllinien trotzdem ein relativ artifizielles System dar, da sie nicht nur zwecks Überexpression mit den Phosphatasen Dep-1 bzw. PTP α stabil transfiziert wurden, sondern auch mit dem PDGF β -R. Aus diesem Grund sollten aus einer Zelllinie mit endogenem PDGF-Rezeptor neue Dep-1-exprimierende Zelllinien hergestellt werden. Um möglichst nahe an einem physiologischen System zu sein, wurden dafür zunächst humane BJ-1 Fibroblasten ausgewählt, mit denen aber leider im Rahmen dieser Arbeit keine

4. Diskussion

Linien erzeugt werden konnten, so dass schließlich NIH3T3-Zellen als Grundlage dafür dienten. Diese Mäusezellen besitzen ebenfalls endogen den PDGF β -R sowie Dep-1. Wildtyp-Dep-1 wurde in den Zellen zu Spiegeln exprimiert, die eventuell das mehrfache des endogenen Spiegels ausmachen. Dies konnte jedoch nicht direkt festgestellt werden, sondern ist aus dem Vergleich mit endogenen Spiegeln in humanen Fibroblasten gefolgert. Deshalb erwies es sich als günstig, daß neben den Zellen mit Überexpression des Phosphatase-Wildtyps auch Linien erzeugt werden konnten, die eine katalytisch inaktive Dep-1-Mutante exprimieren. Bei dieser Mutante wurde das Cystein im katalytischen Zentrum gegen ein Serin ausgetauscht. Dadurch kann die PTP zwar noch an ihre Substrate binden, diese aber nicht mehr dephosphorylieren. So war es möglich zu analysieren, ob für die Effekte von Dep-1 die enzymatische Aktivität oder die bloße Anwesenheit des Proteins notwendig ist und ob gleiche systematische Effekte durch die Transfektion auftreten. Eine Möglichkeit der Funktion der Dep-1C/S-Mutante ist eine dominant negative Wirkung auf endogen vorhandene Dep-1wt. Mit einem solchen Effekt läßt sich am einfachsten erklären, warum die Expression von Dep-1C/S in den NDC-F6-Zellen genau die gegenteiligen Effekte auf Migration, Zell-Matrix-Adhäsion und die Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors im Vergleich zu den PAE-X23 bzw. NDW-H3₂-Zellen mit Dep-1wt hat. Wie stark die dominant negative Wirkung ist, hängt unter anderem vom Verhältnis der Proteinmengen der Mutante zum Wildtyp ab. Dies ist möglicherweise eine Ursache für die häufig auftretenden Schwankungen in den Dep-1C/S-Effekten. Insgesamt ist ein Nachteil der verwendeten Zellsysteme, dass sowohl für PTP α als auch im besonderen für Dep-1 die Spiegel an endogener Phosphatase mit den verfügbaren Antikörpern nicht nachweisbar waren. Damit kann in Abschnitt 3.2. nur indirekt und ungefähr eine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch die Überexpression über den physiologischen Mengen liegt. Bei zu starker Überexpression besteht immer die Möglichkeit unspezifischer Interaktionen mit Proteinen, die normalerweise nicht Substrat der PTP sind. Im Vergleich der Dep-1 Expression zwischen den induzierbaren Systemen und anderen menschlichen Zellen mit endogen nachweisbarer Dep-1 zeigte sich tatsächlich, daß vor allem in der PAE-X23-Linie die PTP sehr stark überexprimiert wird. Da aber die Effekte gleichermaßen in den hochexprimierenden PAE-X23-Zellen und in den sehr viel schwächer exprimierenden NDW-H3₂-Zellen beobachtet werden konnten, ist in Kombination mit der Wirkung der C/S-Mutante davon auszugehen, dass der Einfluss

4. Diskussion

von Dep-1 tatsächlich einer physiologischen Rolle entspricht. Durch die Verwendung der verschiedenen Modellsysteme ist außerdem der Schluss möglich, daß die negative Regulation der PDGF β -R Signalwege und die Verbesserung der Zell-Adhäsion eine generelle Funktion von Dep-1 ist. Leider konnte mit den verfügbaren Zelllinien eine diskutierte Rolle von Dep-1 für die Zelldichte-abhängige Wachstumshemmung nicht untersucht werden, ebenso wenig wie der Einfluss der Phosphatase auf die Proliferation der Zellen überhaupt. Alle Anstrengungen in dieser Richtung ergaben keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse. Haupthindernis für diese Untersuchungen war der Umstand, dass die Proliferation der Zellen nur in geringem Maße durch PDGF oder FCS stimuliert werden konnte und bei den schwachen Änderungen der DNA-Syntheserate bzw. der Zellteilung ein Effekt der Phosphatase von den experimentellen Schwankungen nicht zu unterscheiden war. Da die Proliferation der untransfizierten Mutterzellen relativ gut durch PDGF stimuliert werden kann, liegt die Ursache für diesen Phänotyp der Dep-1-exprimierenden Zellen möglicherweise in der Art und Weise der Herstellung der Klone. Aufgrund der auf dem tricistronischen pNRTIS33-Vektor basierenden Expressionskonstrukte für Dep-1wt und Dep-1C/S ist die G418-Selektion transfizierter Zellen nur im Zustand eingeschalteter Phosphatase-Expression möglich. Falls Dep-1 also die Proliferation hemmt, würden unter diesen Bedingungen solche Klone bevorzugt wachsen, in denen die Phosphatase aus unbekannten Gründen keinen oder nur einen sehr abgeschwächten Einfluss auf die Zellteilung hat. Unter der Voraussetzung, dass die Proliferation der Zellen auch bei Kultivierung in Serumhaltigem Medium unter anderem über den PDGF β -R stimuliert wird und Dep-1 die Signaltransduktion des Rezeptors negativ moduliert, ist zu vermuten, dass bei Selektion in Anwesenheit der PTP solche Zellen einen Vorteil haben, die unabhängig von PDGF oder Dep-1 wachsen. Für diese Überlegungen spräche auch, dass bei der Herstellung der NIH-Zelllinien nur etwa vier Klone mit induzierbarer Wildtyp-Expression, dagegen aber mehr als doppelt so viele Klone mit der Dep-1C/S-Mutante erhalten werden konnten. Auch die Gruppe um Arthur Weiss berichtete über Probleme bei der Erzeugung von Jurkat-Zelllinien mit stabiler Überexpression von Dep-1 (9). Um die Funktion der PTP für die Zellproliferation zu studieren, sind demnach andere Modellsysteme notwendig. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung von Konstrukten für die Transfektion von Zellen, die eine Selektion einzelner Klonen auch in Abwesenheit von Dep-1 ermöglichen. Allerdings handelt es

4. Diskussion

sich auch dabei um Überexpressionssysteme, bei denen der Phosphatase-Spiegel durch die Effizienz des Plasmids und nicht physiologisch durch die Zelle reguliert wird. Die Untersuchung, ob beispielsweise die Expression von Dep-1 in Abhängigkeit von der Zelldichte geändert wird, ist damit unmöglich. Sehr viel günstiger wäre es demnach, die Produktion der PTP auf endogenem Niveau zu kontrollieren. Vorstellbar ist dafür die Verwendung von Zellen aus bisher nicht verfügbaren k.o.-Mäusen oder die gezielte Ausschaltung der Dep-1-Expression in Zelllinien z.B. durch die RNAsi Methode. Bei erstgenannter Variante könnten die Zellen mit Dep-1 k.o. mit solchen Zellen verglichen werden, bei denen entweder Dep-1wt oder die C/S-Mutante nachträglich wieder eingeführt wurde, sofern die Expression dieser Konstrukte auf physiologischem Niveau bleibt. Die RNAsi-Technik ist eine relativ neue Methode, bei der die Expression eines Gens durch die Einführung von kurzen, zu einer Sequenz des Zielgenes komplementären RNA-Doppelsträngen in die Zelle blockiert werden kann. Mittlerweile ist dafür auch nicht mehr die ständige transiente Transfektion von RNA-Oligonukleotiden notwendig, da es DNA-Plasmide gibt, in welche eine für das Gen entsprechend ausgewählte Sequenz eingefügt werden kann und von der dann in der Zelle ständig die passenden RNA-Transkripte hergestellt werden. Da schon bei einer falschen Base in der Nukleotidsequenz der kurzen RNA-Fragmente keine Hemmung der Expression mehr erfolgt, kann mit dieser Methode tatsächlich sehr spezifisch ein einziges Gen oder sogar ein Allel eines Gens ausgeschaltet werden. Versuche in dieser Richtung bezüglich Dep-1 wären als Weiterführung dieser Arbeit vorstellbar. Auch die systematische Analyse mehrerer verschiedener PTP wäre mit dieser Methode möglich. So könnten in entsprechenden Zelllinien mehrere Phosphatasen gleichzeitig ausgeschaltet werden, ohne dass zuvor die Erzeugung von mehrfach-k.o.-Mäusen notwendig ist. Dies würde Erkenntnisse darüber ermöglichen, inwieweit einzelne PTP die Funktion anderer Phosphatasen übernehmen, wie redundant die PTP in den verschiedenen STW sind bzw. welche Rolle die Phosphatasen in verschiedenen Zellen spielen.

4.2. Dep-1 als Regulator des PDGF-Rezeptors

Der PDGF β -R ist in vielen Zellen ein Bestandteil von Signalwegen, die eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und dem Überleben von Zellen sowohl

4. Diskussion

bei der Embryonalentwicklung als auch im erwachsenen Organismus spielen. Dabei konnte für eine Reihe von PTP gezeigt werden, dass sie an den STW des Rezeptors beteiligt sind bzw. mit ihm interagieren können, so auch für Dep-1. Mit dieser Arbeit konnten nun neue Hinweise darauf gewonnen werden, dass Dep-1 tatsächlich in der Lage ist, die Funktion des PDGF β -R zu regulieren. Insbesondere wurde der Einfluss der Phosphatase auf die PDGF-stimulierte Migration untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass diese durch Dep-1wt gehemmt wird. Die negativ regulatorische Wirkung der PTP ist jedoch kein "Ja-Nein" Prozess bei dem durch Anwesenheit von Dep-1wt die Migration komplett blockiert wird, sondern besitzt einen einschränkenden, modulierenden Charakter. So zeigten die NDC-F6-Zellen mit Expression der katalytisch inaktiven C/S-Mutante sogar eine erhöhte Migration in den Versuchen mit dem Boyden-Kammer-System. Um die Frage zu klären, auf welche Weise Dep-1 die Migration beeinflusst, sollten verschiedene potentiell beteiligte Signalwege darauf hin untersucht werden, ob auch sie Änderungen bei An- und Abwesenheit der Phosphatase zeigen. Neben der MAPK-Kaskade wurden PLC γ und der PI3-Kinase-Weg ausgewählt, da ihre Beteiligung an der Steuerung der Migration vielfach in der Literatur diskutiert wird (136, 191). Bereits bekannt war, daß Dep-1 bevorzugt die Bindungsorte des PDGF β -R für PLC γ und PI3-Kinasen dephosphoryliert und weiterhin Wortmannin die Migration fast vollständig blockiert (108). Auch der Src-Kinasen Inhibitor SU6656 hatte einen negativen Einfluß auf die Migration, wenn auch einen weit geringeren als Wortmannin. Deshalb wurde auch der Effekt von Dep-1 auf die PDGF-stimulierte Src-Aktivierung untersucht. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von Dep-1wt die PDGF-stimulierte Aktivität von Ras und nachfolgend auch von Erk drastisch reduziert ist, sowohl PLC γ als auch PI3-Kinase eine geringere Aktivität zeigen und die PDGF-stimulierte Aktivierung von Src verzögert wird. Überraschenderweise ist der Unterschied in der Phosphorylierung von Akt, einem den PI3-Kinasen nachgeschalteten Signalmolekül, bei Zellen mit und ohne Dep-1wt-Expression nicht so groß, wie aufgrund der deutlich reduzierten PI3-Kinase Aktivität in den *in vitro*-Kinase-Assays erwartet wurde. So ist Akt in den NDW-H3₂- und PAE-X23-Zellen mit Phosphatase nur etwas weniger phosphoryliert als in den Vergleichszellen ohne PTP. Zum Teil wurden diese Experimente auch mit den NDC-F6-Zellen mit und ohne Expression der Dep-1C/S-Mutante durchgeführt. Hier konnte eine erhöhte Phosphorylierung von p42/p44-Erk und ebenfalls von Akt

4. Diskussion

beobachtet werden. Diese Effekte stehen in Einklang mit der erhöhten Migration der Zellen in Anwesenheit von Dep-1C/S. Interessanterweise ist der PI3-Kinase-Signalweg zwar essentiell für die PDGF-stimulierte Migration, der negative Einfluß von Dep-1 auf die Aktivität der PI3-Kinase wird aber anscheinend nur begrenzt auf das folgende Signalmolekül Akt übertragen. Damit reguliert Dep-1 entweder nicht über diesen Weg die Migration, oder aber andere, nicht näher untersuchte Effektoren der PI3-Kinase sind an der Signalübertragung beteiligt. In der Literatur lassen sich Hinweise finden, dass die MAPK Erk1/ Erk2 in einigen Zelltypen eine essentielle Rolle für die Zellwanderung und die PDGF-stimulierte Chemotaxis spielen (36, 103). Die Aktivität von Erk soll dabei ausgehend vom PDGF-Rezeptor über PI3-Kinase und Ras stimuliert werden (209). Zwar konnte ein solcher Signalweg mit den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen nicht bewiesen werden, wäre aber aufgrund der Befunde denkbar. So werden sowohl Ras als auch Erk in den PAE- und NIH3T3-Zellen durch PDGF aktiviert, die Stimulation dieser Enzyme ist ebenso wie die der PI3-Kinase in den Dep-1wt exprimierenden Zellen deutlich reduziert und Vorbehandlung der Zellen mit Wortmannin hemmt auch die PDGF-stimulierte Phosphorylierung der MAPK. Falls also die Aktivität von Erk1/ Erk2 tatsächlich wichtig für die Regulation der Zell-Migration ist, könnte damit der negative Einfluss von Dep-1 auf diesen Prozess ausgehend vom aktivierten PDGF β -R über die PI3-Kinasen, gefolgt von Ras und die MAPK-Kaskade vermittelt werden. Diese Hypothese könnte durch die Verwendung geeigneter Inhibitoren wie z.B. PD 98059 bei den Migrationsexperimenten noch weiter erhärtet werden. Ein weiterer, für die Migration wichtiger und durch Dep-1 regulierter Signalweg beinhaltet PLC γ . Die Produktion von Phosphoinositolen nach Stimulation der PAE-X23-Zellen ist deutlich reduziert, wenn Dep-1 exprimiert wird, und vermutlich ist das auch der Grund für die verringerte Migration. Um darüber jedoch eine klare Aussage treffen zu können, müssten auch hier weitere, der PLC γ nachgeschaltete Signalproteine untersucht werden, was im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich war. Letztlich konnte kein einzelner Signalweg identifiziert werden, über welchen Dep-1 die Migration beeinflusst. Vermutlich wird der Effekt über einen kombinierten Einfluss auf den PI3-Kinase-Weg, den PLC γ -Weg und den MAPK-Weg ausgelöst. Im Zusammenhang mit der Zell-Migration sollte ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden, dass Dep-1 auch die Zell-Matrix-Adhäsion beeinflusst. Die Zellen mit Expression der Wildtyp-Phosphatase adhären deutlich besser an eine extrazelluläre

4. Diskussion

Matrix als die mit ATC kultivierten Zellen, und bei Expression der C/S-Mutante wird die Anheftung der Zellen sogar behindert. Es ist deshalb denkbar, dass die Zellen mit Dep-1wt auch deshalb weniger wandern, weil sie fester an der Matrix haften. Die PDGF-stimulierte Chemotaxis aber auch die spontane Migration und die FCS-stimulierte Migration könnten dadurch beeinflusst werden. Allerdings sind die Auswirkungen von Dep-1 auf die Zell-Matrix-Adhäsion bei weitem nicht so groß, wie der negative Effekt auf die PDGF-stimulierte Migration. Während beispielsweise die Zahl der gewanderten NDW-H3₂-Zellen mit Dep-1wt bis zu 50% geringer war als die Zahl der Zellen ohne Phosphatase, konnte ein etwa gleicher Unterschied in der Adhäsion nur bis zu maximal einer Stunde beobachtet werden. Danach war die Zahl adhärierter Zellen mit und ohne ATC sehr ähnlich. Wenn also die reduzierte, PDGF-stimulierte Migration allein auf der veränderten Zell-Adhäsion basieren würde, hätten sich die Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne Dep-1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in der Boyden-Kammer ändern müssen. Bei entsprechenden, hier nicht gezeigten, Vorversuchen, konnte ein solches Phänomen jedoch nicht beobachtet werden. Die Effekte auf Zell-Migration, inklusive der Modulation der verschiedenen STW des PDGFβ-R und auf die Zell-Matrix-Adhäsion sind unserer Meinung nach zwei voneinander verschiedene Funktionen von Dep-1, wobei Anheftung und Wanderung der Zellen nicht völlig getrennt werden können.

Im Laufe dieser Arbeit konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, welches die Angriffspunkte von Dep-1 in den STW des PDGF-Rezeptors sind. Zwar ist die Phosphatase in der Lage, selektiv einzelne Phospho-Tyrosine des Rezeptors in Abhängigkeit von der umgebenden Sequenz zu dephosphorylieren sowie auch die gesamte Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors und weiterer Phospho-Proteine in Dep-1wt exprimierenden Zellen abzuschwächen. Trotzdem kann die direkte Beeinflussung anderer Signalproteine nicht ausgeschlossen werden. So ist es wahrscheinlich, dass die verringerte Aktivität der PLCγ oder auch der PI3-Kinase dadurch verursacht werden, daß beide Proteine aufgrund der Dephosphorylierung ihrer Bindungsstellen im Rezeptor nicht mehr mit diesem assoziieren und nachfolgend durch ihn auch nicht mehr durch Phosphorylierung aktiviert werden können. Z.B. könnte Dep-1 selbst direkt die PLCγ durch Dephosphorylierung entsprechender Tyrosine inaktivieren. Im Falle der T-Zell-Aktivierung in Jurkat-Zellen wurde eine Dep-1 abhängige PLCγ-Dephosphorylierung beschrieben (9). Eine solche direkte Interaktion

4. Diskussion

konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden. Auch der Nachweis einer geänderten Assoziation von PI3-Kinase und PLC γ an den PDGF β -R in Dep-1-exprimierenden Zellen, beispielsweise durch entsprechende Immunoblots nach Immunpräzipitation der RTK, steht noch aus. Dep-1 hatte sehr unterschiedliche Effekte auf zwei untersuchte Src-Pools. Die beobachtete Regulation der Adhäsions-abhängigen Src-Kinase-Aktivität durch Dep-1 könnte direkt erfolgen. Src wird in den Adhäsionskomplexen (unabhängig von PDGF) bei Expression von Dep-1wt in der Zelle schneller aktiviert. Dies geschieht entweder durch Dephosphorylierung des inhibitorischen Tyr⁵²⁹ oder könnte potentiell auch durch dessen Verdrängung aus der SH2-Domäne durch die Bindung eines anderen Phospho-Tyrosins geschehen. Für die Aktivierung von Src durch PTP α konnte ein solcher Vorgang gezeigt werden (222). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für Dep-1 denkbar, eine Bindung der Phosphatase an Src konnte durch versuchte Co-Immunpräzipitation jedoch innerhalb dieser Arbeit weder bewiesen noch ausgeschlossen werden. Weiter führende Versuche mit der katalytisch inaktiven und daher oft stabilere Komplexe bildenden C/S-Mutante könnten diesbezüglich Klarheit bringen. Der andere Src-Pool umfasst die durch PDGF-stimulierten Src-Kinasen. Allerdings ist auch hier nicht ganz klar, ob die verzögerte Src Aktivierung bei Expression von Dep-1 auf die Dephosphorylierung des Rezeptors oder von Src selbst zurückzuführen ist. In letzterem Fall käme dafür nur eine Dephosphorylierung der Tyrosine 215 und 418 in Frage, da es unwahrscheinlich ist, dass Dep-1 die Dephosphorylierung des Tyr⁵²⁹ verzögert. Wieso besitzt dann die Phosphatase aber je nach Lokalisation der Src-Kinase unterschiedliche Präferenzen für die Tyrosine? Entweder erfolgt die negative Regulation der Aktivierung dieser PDGF-stimulierten Src-Spezies durch Dep-1 derart, dass, nachdem Src mit seiner SH2-Domäne an den PDGF β -R gebunden hat und von diesem phosphoryliert wurde, die entsprechenden Tyrosine sofort wieder dephosphoryliert werden. Allerdings könnte damit die Substratspezifität von Dep-1 bezüglich der Tyrosine von Src auch nicht geklärt werden. Wahrscheinlicher ist hier eine Dephosphorylierung von Tyr^{579/581} (Src Bindungsort) im PDGF β -R und eine dadurch verminderte Bindung von Src an den Rezeptor.

4.3. PTP1B und PTP α im Vergleich mit Dep-1

PTP α und insbesondere PTP1B sind hinsichtlich verschiedenster Signaltransduktionsprozesse bereits ausführlich untersucht worden. Deshalb wurden sie in dieser Arbeit nur in einigen ausgewählten Experimenten, vergleichend zu Dep-1, untersucht. Diese umfassten Migration, Zell-Matrix-Adhäsion und die Aktivierung der Ras - MAPK- Kaskade. Dabei zeigte sich, dass sich PTP1B und PTP α in Bezug auf die PDGF stimulierten Effekte teilweise gegensätzlich zu Dep-1 verhalten. So ist die PDGF-abhängige Migration bei PTP α -exprimierenden Zellen gegenüber den Zellen ohne Phosphatase deutlich erhöht und auch die PTP $^{+/-}$ -Zellen wandern besser als die PTP1B-k.o.-Linie. In letzterem Fall ist das aber wahrscheinlich eher auf die stark reduzierte und verzögerte Zell-Matrix-Adhäsion der PTP1B $^{-/-}$ Zellen zurück zu führen, als auf einen Einfluss der PTP1B auf die Signalübertragung des PDGF β -R. Vermutlich wird der stimulierende Einfluß von PTP α auf die Migration durch Modulation der PDGF-stimulierten Signalwege erreicht. So sind auch PDGF-stimulierte Ras- und Erk1/ Erk2-Aktivierung in Zellen mit PTP α -Überexpression gegenüber den Zellen ohne Phosphatase erhöht. Wie diese Phosphatase den positiven Effekt auf Migration, Ras und MAPK-Aktivierung ausübt ist bisher nicht klar. Vermutlich spielt dabei aber Src eine wichtige Rolle, das an die PTP assoziiert und durch sie unter Dephosphorylierung des inhibitorischen Tyr⁵²⁹ aktiviert wird (75, 222). Die Erhöhung der Aktivität von Ras und Erk1/ 2 könnte entsprechend sekundär zur PTP α -verursachten Src-Aktivierung erfolgen.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit (Zusammenfassung siehe Tabelle 4-I) und den Daten in der Literatur sind alle drei untersuchten PTP in der Lage, die STW des PDGF β -R zu regulieren.

4. Diskussion

Effekt der Phosphatase auf PDGF stimulierte Aktivierung von:	Dep-1	PTP1B	PTPa
Migration	gehemmt	erhöht*	erhöht
Ras	gehemmt	nicht untersucht	erhöht
MAPK	gehemmt	nicht untersucht	leicht erhöht
PI3-Kinase	gehemmt	nicht untersucht	nicht untersucht
Akt	leicht gehemmt	nicht untersucht	nicht untersucht
PLC	gehemmt	nicht untersucht	nicht untersucht
Src	verzögert	nicht untersucht	nicht untersucht
Effekt der Phosphatase auf:			
Zell-Matrix-Adhäsion	erhöht	stark erhöht	nicht untersucht
Adhäsions stimulierte Src Aktivierung	beschleunigt und leicht erhöht	nicht untersucht	nicht untersucht

Tabelle 4-I: Zusammenfassung der untersuchten Effekte der PTP Dep-1, PTP1B und PTPa *-beruht wahrscheinlich auf dem Effekt auf die Zell-Matrix-Adhäsion

Es ist jedoch weiterhin nicht gesichert, inwieweit dies auch physiologische Funktionen der Phosphatasen sind. Dazu wäre es wichtig, Phänotypen in Zellen mit depletierten endogenen PTP zu analysieren. Zellen aus PTP α -k.o.-Mäusen sind bisher bezüglich der PDGF-Rezeptor-Signaltransduktion nicht untersucht. Im Falle von PTP1B-k.o.-Mäusen ist der PDGF-Rezeptor hyperphosphoryliert, jedoch läßt sich kein klarer physiologischer Phänotyp in den Zellen oder entsprechenden Tieren ausmachen (72, 73). Vermutlich sind weitere PTP an der PDGF-Rezeptor-Regulation beteiligt, so dass der Effekt einer alleinigen PTP1B-Ausschaltung keine ausreichende Relevanz für das PDGF-Rezeptor-System hat. Im wesentlichen wurde nur für den Insulin-Rezeptor eine biologisch relevante Hyper-Aktivität in den PTP1B-k.o.-Mäusen beobachtet (70). Dep-1-k.o.-Mäuse sind bisher nicht verfügbar. Allerdings konnte für Dep-1 eine Rolle als Tumorsuppressor wahrscheinlich gemacht werden (168). Es ist eine Interessante Frage, inwieweit die in dieser Arbeit beobachteten Effekte von Dep-1 mit der Funktion als Tumorsuppressor in Beziehung stehen könnten.

4. Diskussion

Einige der bisher dargestellten biologischen Funktionen der Phosphatasen sind in Tabelle 4-II zusammengefaßt.

Phosphatase	Funktion
Dep-1	<ul style="list-style-type: none">• bei Aktivierung, Differenzierung von Leukozyten (negative Regulation des T-Zell-Rezeptors)(5, 9, 49, 53, 67, 148, 174, 193-195)• Antigen bei Auto-immunerkrankung (132)• Tumorsuppressor bei Dickdarm-, Lungen-, Schilddrüsen-, Mammakarzinomen,... (100, 131, 168, 201, 218)• Entwicklung der Glomeruli und Gefäße in Nieren (189)• Zell-Zell-Kontakt (81)
PTP1B	<ul style="list-style-type: none">• negative Regulation des Insulin-Rezeptors (27, 70, 72, 135, 143, 177, 192, 196)• negative Regulation des Leptin-Rezeptors (29, 39, 92, 99, 118, 215)• negative Regulation des PDGF- und PDGF-Rezeptors (72, 73)• bei Zell-Matrix-Adhäsion, (Aktivierung von Src, Phosphorylierung von FAK und p130CAS) (28, 126)• Regulation der Src-Aktivität (in Mammacarcinomen) (145, 205, 217)
PTPa	<ul style="list-style-type: none">• Regulation der Mitose durch Src-Aktivierung (220, 221)• Regulation der Src-Aktivität bei Zell-Matrix-Adhäsion (75, 216)• Onkogen (151, 221, 224)

Tabelle 4-II: Biologische Funktionen der PTP Dep-1, PTP1B und PTPa

PTP besitzen offensichtlich nicht nur ein einziges Substrat, und eine Phosphatase kann so in Abhängigkeit von der Expression, der zellulären Lokalisation und der Interaktion mit anderen Effektoren durchaus mehrere Funktionen ausüben.

4.4. Regulation des PDGFB-R durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Auch umgekehrt betrachtet kann ein einziges Substrat wie etwa der PDGFβ-R durch verschiedene Protein-Tyrosin-Phosphatasen reguliert werden. Bisher konnten einige solcher PTP identifiziert werden, wobei aber für keine von ihnen eine ausschließliche Spezifität für den PDGF-Rezeptor gezeigt werden konnte. Dabei sind

4. Diskussion

die Phosphatasen teilweise an der Modulation der gleichen Signalwege beteiligt, manche werden ihrerseits in ihrer Funktion durch den Rezeptor kontrolliert. In Tabelle 4-III ist unter Einbeziehung der Daten aus dieser Arbeit dargestellt, welche PTP bekanntermaßen *in vivo* oder *in vitro* mit dem PDGFβ-R interagieren.

PTP	An Interaktion beteiligte Phospho-Tyrosine im PDGFβ-R	Modell-System	Effekte
Dep-1	Tyr ¹⁰²¹ , Tyr ¹⁰⁰⁹ , Tyr ⁷⁵¹ (durch PTP dephosphoryliert) Tyr ⁸⁵⁷ , Tyr ⁵⁶² (schwach durch PTP dephosphoryliert)	<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression in PAE-Zellen • synthetische Peptide • Überexpression in HEK293-Zellen • Überexpression in PAE-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • selektive Dephosphorylierung der Tyrosine im Rezeptor (108) • Dephosphorylierung des Rezeptors (71) • Reduzierte Migration • PDGF-stimulierte Ras-, MAPK-, PLC-, Src-, PI3-Kinase-Aktivierung gehemmt
PTPa		<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression in HEK293-Zellen • Überexpression in PAE-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Dephosphorylierung des Rezeptors bei sehr hohen PTP-Spiegeln (71) • Erhöhte Migration • PDGF-stimulierte Ras- und MAPK-Aktivierung verstärkt
PTP1B		<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression des Rezeptors und der PTP in A431-Zellen • Überexpression des Rezeptors und der PTP in HEK293-Zellen • k.o.-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Assoziation der PTP an aktivierten Rezeptor (125) • Dephosphorylierung des Rezeptors (112) • Dephosphorylierung des Rezeptors • Hemmung der MAPK (72, 73)

4. Diskussion

SHP2	Tyr ¹⁰⁰⁹ (Bindung der PTP) Tyr ⁷⁷¹ durch PTP dephosphoryliert	<ul style="list-style-type: none"> • Expression von Wildtyp Rezeptor und Y1009F Mutanten in PAE-Zellen • ATWT-, AT1009-, NIH3T3-Zellen • Rat1-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • positive Regulation der FAK-Aktivität und Migration • positive Regulation der Ras- und MAPK-Aktivität (14, 59, 91) • Inaktivierung der PTP durch Oxidation nach Stimulation des Rezeptors (140)
LMW-PTP		<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression der PTP und verschiedener Mutanten in NIH3T3-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • PDGF-stimulierte Phosphorylierung der PTP an Tyr¹³¹ und Tyr¹³² (34) • Dephosphorylierung des Rezeptors (31) • Hemmung der PDGF-stimulierten Proliferation (37, 158, 181) • Regulation der Zell-Matrix-Adhäsion und -Migration (32, 34)
T-Zell-Phosphatase		<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression des Rezeptors und der PTP in HEK293-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Dephosphorylierung des Rezeptors (112)
CD45		<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression des Rezeptors und der PTP in HEK293-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Dephosphorylierung des Rezeptors (112)

Tabelle 4-III: PTP die potentiell an der Regulation des PDGFb-R beteiligt sind

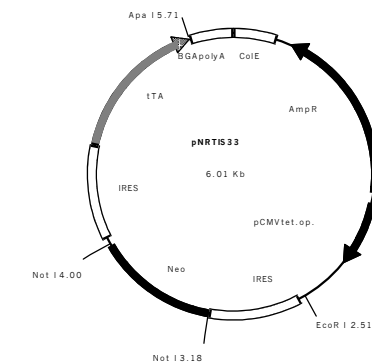
Das Zusammenspiel zwischen RTK und den PTP ist äußerst komplex und bisher ist die Bedeutung der Tyrosin-Phosphatasen für die Regulation der Rezeptoren nur in Anfängen verstanden. Die bisherigen Daten und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten allerdings darauf hin, dass verschiedene Phosphatasen für die STW einer RTK unterschiedliche Rollen spielen können. Dabei sind die PTP in der Lage nicht nur negative Regulation von Signalwegen zu bewirken, sondern auch stimulatorische Effekte, z.B. auf Migration, Adhäsion und Proliferation zu vermitteln. Die hier gezeigten Ergebnisse der unterschiedlichen Modulation PDGF-stimulierter Signalwege,

4. Diskussion

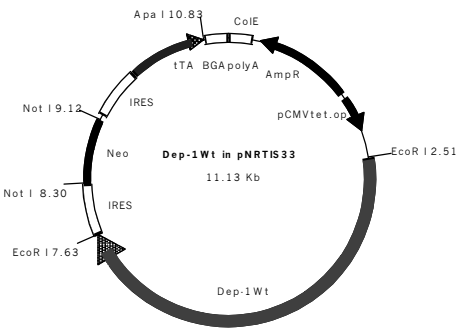
der Migration und der Zell-Matrix-Adhäsion durch die PTP Dep-1, PTP1B und PTP α weisen trotz der erwähnten Beschränkungen der Zellsysteme darauf hin, dass Tyrosin-Phosphatasen spezifisch und voneinander unterscheidbar den PDGF β -R regulieren.

5. Anhang

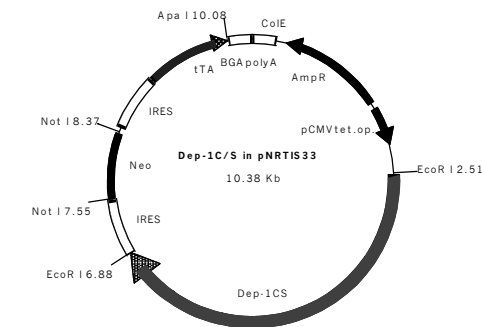
5.1. Appendix-I



Plasmid name: pNRTIS33
Plasmid size: 6.01 kb
Constructed by: ?
Construction date: ?
Comments/References: none



Plasmid name: Dep-1Wt in pNRTIS33
Plasmid size: 11.13 kb
Constructed by: Enrico Jandt
Construction date: 2000
Comments/References:



Plasmid name: Dep-1C/S in pNRTIS33
Plasmid size: 10.38 kb
Constructed by: Enrico Jandt
Construction date: 2000
Comments/References:

5.2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ATC	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CAM	cell adhesion molecule, Zelladhäsionsmolekül
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation, Differenzierungs-Antigen
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DNA	desoxyribonucleinic acid, Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FAK	focal adhesion kinase, Kinase in fokalen Adhäsionskomplexen
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FN	Fibronectin-artig
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotide exchange factor, Guanin-Nukleotid Austausch-Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IP ₃	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
kB	kiloBasen, 1000 Basenpaare
kDA	kiloDalton
k.o.	knock-out

5. Anhang

min	Minute
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP/ ERK-Kinase
MW	Molekular Weight, Molekulargewicht
NCS	Newborn Calf Serum, Serum von Neugeborenen Kälbern
PAE	porcine-aortic-endothelia, Schweine-aorta-endothel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	platelet derived growth factor, von Blutplättchen stammender Wachstumsfaktor
PDGF β -R	PDGF-beta-Rezeptor
PLC	Phospholipase C
PK	Proteinkinase
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
Ras	Rat Sarcoma, Ratten-Sarkom
RPTP	rezeptorähnliche Protein-Tyrosinphosphatase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
Ser	Serin
SH	Src homolog
Sos	Son of Sevenless
STW	Signaltransduktionsweg
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
z.B.	zum Beispiel
zTK	zytosolische Tyrosin-Kinasen

5.3. Literaturverzeichnis

1. Aase, K., A. Abramsson, L. Karlsson, C. Betsholtz, and U. Eriksson. 2002. Expression analysis of PDGF-C in adult and developing mouse tissues. *Mech Dev* 110:187-91.
2. Ahmad, F., R. V. Considine, T. L. Bauer, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, and B. J. Goldstein. 1997. Improved sensitivity to insulin in obese subjects following weight loss is accompanied by reduced protein-tyrosine phosphatases in adipose tissue. *Metabolism* 46:1140-5.
3. Angers-Loustau, A., J. F. Cote, and M. L. Tremblay. 1999. Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol* 77:493-505.
4. Arregui, C. O., J. Balsamo, and J. Lilien. 1998. Impaired integrin-mediated adhesion and signaling in fibroblasts expressing a dominant-negative mutant PTP1B. *J Cell Biol* 143:861-73.
5. Autschbach, F., E. Palou, G. Mechtersheimer, C. Rohr, F. Piroto, N. Gassler, H. F. Otto, B. Schraven, and A. Gaya. 1999. Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues. *Tissue Antigens* 54:485-98.
6. Avruch, J., A. Khokhlatchev, J. M. Kyriakis, Z. Luo, G. Tzivion, D. Vavvas, and X. F. Zhang. 2001. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 56:127-55.
7. Bae, Y. S., J. Y. Sung, O. S. Kim, Y. J. Kim, K. C. Hur, A. Kazlauskas, and S. G. Rhee. 2000. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:10527-31.
8. Bagrodia, S., I. Chackalaparampil, T. E. Kmiecik, and D. Shalloway. 1991. Altered tyrosine 527 phosphorylation and mitotic activation of p60c-src. *Nature* 349:172-5.
9. Baker, J. E., R. Majeti, S. G. Tangye, and A. Weiss. 2001. Protein tyrosine phosphatase CD148-mediated inhibition of T-cell receptor signal transduction is associated with reduced LAT and phospholipase Cgamma1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 21:2393-403.
10. Balsamo, J., T. Leung, H. Ernst, M. K. Zanin, S. Hoffman, and J. Lilien. 1996. Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. *J Cell Biol* 134:801-13.
11. Bao, J., I. Alroy, H. Waterman, E. D. Schejter, C. Brodie, J. Gruenberg, and Y. Yarden. 2000. Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *J Biol Chem* 275:26178-86.
12. Barone, M. V., and S. A. Courtneidge. 1995. Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src. *Nature* 378:509-12.
13. Bar-Sagi, D. 2001. A Ras by any other name. *Mol Cell Biol* 21:1441-3.

14. Bennett, A. M., T. L. Tang, S. Sugimoto, C. T. Walsh, and B. G. Neel. 1994. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7335-9.
15. Bergsten, E., M. Uutela, X. Li, K. Pietras, A. Ostman, C. H. Heldin, K. Alitalo, and U. Eriksson. 2001. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 3:512-6.
16. Berthiaume, L. G. 2002. Insider information: how palmitoylation of Ras makes it a signaling double agent. *Sci STKE* 2002:PE41.
17. Bilwes, A. M., J. den Hertog, T. Hunter, and J. P. Noel. 1996. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* 382:555-9.
18. Blume-Jensen, P., and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-65.
19. Borges, L. G., R. A. Seifert, F. J. Grant, C. E. Hart, C. M. Disteché, S. Edelhoff, F. F. Solca, M. A. Lieberman, V. Lindner, E. H. Fischer, S. Lok, and D. F. Bowen-Pope. 1996. Cloning and characterization of rat density-enhanced phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circ Res* 79:570-80.
20. Boriack-Sjodin, P. A., S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. 1998. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394:337-43.
21. Bostrom, H., K. Willetts, M. Pekny, P. Leveen, P. Lindahl, H. Hedstrand, M. Pekna, M. Hellstrom, S. Gebre-Medhin, M. Schalling, M. Nilsson, S. Kurland, J. Tornell, J. K. Heath, and C. Betsholtz. 1996. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85:863-73.
22. Broome, M. A., and T. Hunter. 1996. Requirement for c-Src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. *J Biol Chem* 271:16798-806.
23. Brown, M. T., and J. A. Cooper. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287:121-49.
24. Burke, P., K. Schooler, and H. S. Wiley. 2001. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell* 12:1897-910.
25. Cai, J., S. A. Phelan, A. L. Hill, and M. R. Loeken. 1998. Identification of Dep-1, a new gene regulated by the transcription factor Pax-3, as a marker for altered embryonic gene expression during diabetic pregnancy. *Diabetes* 47:1803-5.
26. Chang, M. C., Y. T. Chang, M. S. Wu, C. T. Shun, Y. W. Tien, and J. T. Lin. 2001. K-ras mutation at codon 12 in stage I pancreatic adenocarcinoma: analysis by laser capture microdissection and direct sequencing. *J Formos Med Assoc* 100:352-4.
27. Chen, H., S. J. Wertheimer, C. H. Lin, S. L. Katz, K. E. Amrein, P. Burn, and M. J. Quon. 1997. Protein-tyrosine phosphatases PTP1B and syp are modulators of insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *J Biol Chem* 272:8026-31.

28. Cheng, A., G. S. Bal, B. P. Kennedy, and M. L. Tremblay. 2001. Attenuation of adhesion-dependent signaling and cell spreading in transformed fibroblasts lacking protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem* 276:25848-55.
29. Cheng, A., N. Uetani, P. D. Simoncic, V. P. Chaubey, A. Lee-Loy, C. J. McGlade, B. P. Kennedy, and M. L. Tremblay. 2002. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2:497-503.
30. Chernoff, J. 1999. Protein tyrosine phosphatases as negative regulators of mitogenic signaling. *J Cell Physiol* 180:173-81.
31. Chiarugi, P., P. Cirri, G. Raugei, G. Camici, F. Dolfi, A. Berti, and G. Ramponi. 1995. PDGF receptor as a specific in vivo target for low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett* 372:49-53.
32. Chiarugi, P., P. Cirri, L. Taddei, E. Giannoni, G. Camici, G. Manao, G. Raugei, and G. Ramponi. 2000. The low M(r) protein-tyrosine phosphatase is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. *J Biol Chem* 275:4640-6.
33. Chiarugi, P., P. Cirri, M. L. Taddei, D. Talini, L. Doria, T. Fiaschi, F. Buricchi, E. Giannoni, G. Camici, G. Raugei, and G. Ramponi. 2002. New perspectives in PDGF receptor downregulation: the main role of phosphotyrosine phosphatases. *J Cell Sci* 115:2219-32.
34. Chiarugi, P., M. L. Taddei, P. Cirri, D. Talini, F. Buricchi, G. Camici, G. Manao, G. Raugei, and G. Ramponi. 2000. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase controls the rate and the strength of NIH-3T3 cells adhesion through its phosphorylation on tyrosine 131 or 132. *J Biol Chem* 275:37619-27.
35. Chioeches, A., H. F. Paterson, R. Marais, A. Clerk, C. J. Marshall, and P. H. Sugden. 1999. Regulation of Ras.GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J Biol Chem* 274:19762-70.
36. Choudhury, G. G., C. Karamitsos, J. Hernandez, A. Gentilini, J. Bardgette, and H. E. Abboud. 1997. PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF. *Am J Physiol* 273:F931-8.
37. Cirri, P., P. Chiarugi, L. Taddei, G. Raugei, G. Camici, G. Manao, and G. Ramponi. 1998. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J Biol Chem* 273:32522-7.
38. Claesson-Welsh, L. 1996. Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 28:373-85.
39. Cook, W. S., and R. H. Unger. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B: a potential leptin resistance factor of obesity. *Dev Cell* 2:385-7.
40. Cool, R. H., G. Schmidt, C. U. Lenzen, H. Prinz, D. Vogt, and A. Wittinghofer. 1999. The Ras mutant D119N is both dominant negative and activated. *Mol Cell Biol* 19:6297-305.

41. Cooper, J. A., F. S. Esch, S. S. Taylor, and T. Hunter. 1984. Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 259:7835-41.
42. Cote, J. F., A. Charest, J. Wagner, and M. L. Tremblay. 1998. Combination of gene targeting and substrate trapping to identify substrates of protein tyrosine phosphatases using PTP-PEST as a model. *Biochemistry* 37:13128-37.
43. Courtneidge, S. A., S. Fumagalli, M. Koegl, G. Superti-Furga, and G. M. Twamley-Stein. 1993. The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions. *Dev Suppl*:57-64.
44. Cuncic, C., N. Detich, D. Ethier, A. S. Tracey, M. J. Gresser, and C. Ramachandran. 1999. Vanadate inhibition of protein tyrosine phosphatases in Jurkat cells: modulation by redox state. *J Biol Inorg Chem* 4:354-9.
45. Cunningham, L. D., P. Brecher, and R. A. Cohen. 1992. Platelet-derived growth factor receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxation via nitric oxide in rat aorta. *J Clin Invest* 89:878-82.
46. Czuwara-Ladykowska, J., E. A. Gore, D. A. Shegogue, E. A. Smith, and M. Trojanowska. 2001. Differential regulation of transforming growth factor-beta receptors type I and II by platelet-derived growth factor in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* 145:569-75.
47. Daum, G., S. Regenass, J. Sap, J. Schlessinger, and E. H. Fischer. 1994. Multiple forms of the human tyrosine phosphatase RPTP alpha. Isozymes and differences in glycosylation. *J Biol Chem* 269:10524-8.
48. Daum, G., N. F. Zander, B. Morse, D. Hurwitz, J. Schlessinger, and E. H. Fischer. 1991. Characterization of a human recombinant receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 266:12211-5.
49. de la Fuente-Garcia, M. A., J. M. Nicolas, J. H. Freed, E. Palou, A. P. Thomas, R. Vilella, J. Vives, and A. Gaya. 1998. CD148 is a membrane protein tyrosine phosphatase present in all hematopoietic lineages and is involved in signal transduction on lymphocytes. *Blood* 91:2800-9.
50. de Rooij, J., and J. L. Bos. 1997. Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14:623-5.
51. Debant, A., C. Serra-Pages, K. Seipel, S. O'Brien, M. Tang, S. H. Park, and M. Streuli. 1996. The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5466-71.
52. Deguchi, J., J. Abe, M. Makuuchi, and Y. Takuwa. 1999. Inhibitory effects of trapidil on PDGF signaling in balloon-injured rat carotid artery. *Life Sci* 65:2791-9.
53. del Pozo, V., F. Piroto, B. Cardaba, I. Cortegano, S. Gallardo, M. Rojo, I. Arrieta, E. Aceituno, P. Palomino, A. Gaya, and C. Lahoz. 2000. Expression on human eosinophils of CD148: a membrane tyrosine phosphatase. Implications in the effector function of eosinophils. *J Leukoc Biol* 68:31-7.
54. den Hertog, J. 1999. Protein-tyrosine phosphatases in development. *Mech Dev* 85:3-14.

55. den Hertog, J., and T. Hunter. 1996. Tight association of GRB2 with receptor protein-tyrosine phosphatase alpha is mediated by the SH2 and C-terminal SH3 domains. *Embo J* 15:3016-27.
56. den Hertog, J., S. Tracy, and T. Hunter. 1994. Phosphorylation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha on Tyr789, a binding site for the SH3-SH2-SH3 adaptor protein GRB-2 in vivo. *Embo J* 13:3020-32.
57. Dixon, J. E. 1996. Protein tyrosine phosphatases: their roles in signal transduction. *Recent Prog Horm Res* 51:405-14; discussion 415.
58. Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, E. Y. Chan, S. L. Stang, R. J. Dunn, and J. C. Stone. 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280:1082-6.
59. Ekman, S., A. Kallin, U. Engstrom, C. H. Heldin, and L. Ronnstrand. 2002. SHP-2 is involved in heterodimer specific loss of phosphorylation of Tyr771 in the PDGF beta-receptor. *Oncogene* 21:1870-5.
60. Esteban, L. M., C. Vicario-Abejon, P. Fernandez-Salguero, A. Fernandez-Medarde, N. Swaminathan, K. Yienger, E. Lopez, M. Malumbres, R. McKay, J. M. Ward, A. Pellicer, and E. Santos. 2001. Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 21:1444-52.
61. Fiaschi, T., P. Chiarugi, F. Buricchi, E. Giannoni, M. L. Taddei, D. Talini, G. Cozzi, S. Zecchi-Orlandini, G. Rauegi, and G. Ramponi. 2001. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase is involved in growth inhibition during cell differentiation. *J Biol Chem* 276:49156-63.
62. Flint, A. J., T. Tiganis, D. Barford, and N. K. Tonks. 1997. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1680-5.
63. Florio, T., A. Scorziello, S. Thellung, S. Salzano, M. T. Berlingieri, A. Fusco, and G. Schettini. 1997. Oncogene transformation of PC C13 clonal thyroid cell line induces an autonomous pattern of proliferation that correlates with a loss of basal and stimulated phosphotyrosine phosphatase activity. *Endocrinology* 138:3756-63.
64. Forsell, P. A., Y. Boie, J. Montalibet, S. Collins, and B. P. Kennedy. 2000. Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes. *Gene* 260:145-53.
65. Frame, M. C., V. J. Fincham, N. O. Carragher, and J. A. Wyke. 2002. v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:233-45.
66. Futatsugi, N., and M. Tsuda. 2001. Molecular dynamics simulations of Gly-12-->Val mutant of p21(ras): dynamic inhibition mechanism. *Biophys J* 81:3483-8.
67. Gaya, A., F. Pirotto, E. Palou, F. Autschbach, V. Del Pozo, J. Sole, and C. Serra-Pages. 1999. CD148, a new membrane tyrosine phosphatase involved in leukocyte function. *Leuk Lymphoma* 35:237-43.
68. Giese, N. A., M. M. Marijjanowski, O. McCook, A. Hancock, V. Ramakrishnan, L. J. Fretto, C. Chen, A. B. Kelly, J. A. Koziol, J. N. Wilcox, and S. R. Hanson.

1999. The role of alpha and beta platelet-derived growth factor receptor in the vascular response to injury in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:900-9.
69. Gilbertson, D. G., M. E. Duff, J. W. West, J. D. Kelly, P. O. Sheppard, P. D. Hofstrand, Z. Gao, K. Shoemaker, T. R. Bukowski, M. Moore, A. L. Feldhaus, J. M. Humes, T. E. Palmer, and C. E. Hart. 2001. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem* 276:27406-14.
70. Goldstein, B. J., F. Ahmad, W. Ding, P. M. Li, and W. R. Zhang. 1998. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem* 182:91-9.
71. Gross, S., A. Knebel, T. Tenev, A. Neininger, M. Gaestel, P. Herrlich, and F. D. Bohmer. 1999. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274:26378-86.
72. Haj, F. G., B. Markova, L. D. Klamann, F. D. Bohmer, and B. G. Neel. 2002. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B). *J Biol Chem*.
73. Haj, F. G., P. J. Verveer, A. Squire, B. G. Neel, and P. I. Bastiaens. 2002. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* 295:1708-11.
74. Hall, B. E., S. S. Yang, P. A. Boriack-Sjodin, J. Kuriyan, and D. Bar-Sagi. 2001. Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 and switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem* 276:27629-37.
75. Harder, K. W., N. P. Moller, J. W. Peacock, and F. R. Jirik. 1998. Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* 273:31890-900.
76. Heidaran, M. A., J. H. Pierce, R. A. Jensen, T. Matsui, and S. A. Aaronson. 1990. Chimeric alpha- and beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity. *J Biol Chem* 265:18741-4.
77. Heldin, C. H., A. Ostman, and L. Ronnstrand. 1998. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1378:F79-113.
78. Heldin, C. H., and B. Westermark. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283-316.
79. Hermanson, M., K. Funa, M. Hartman, L. Claesson-Welsh, C. H. Heldin, B. Westermark, and M. Nister. 1992. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52:3213-9.
80. Heuchel, R., A. Berg, M. Tallquist, K. Ahlen, R. K. Reed, K. Rubin, L. Claesson-Welsh, C. H. Heldin, and P. Soriano. 1999. Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11410-5.

81. Holsinger, L. J., K. Ward, B. Duffield, J. Zachwieja, and B. Jallal. 2002. The transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase DEP1 interacts with p120(ctn). *Oncogene* 21:7067-76.
82. Honda, H., J. Inazawa, J. Nishida, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1994. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP eta. *Blood* 84:4186-94.
83. Hooft van Huijsduijnen, R. 1998. Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest. *Gene* 225:1-8.
84. Humphries, M. J. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28:311-39.
85. Hundt, M., and R. E. Schmidt. 1997. Functional characterization of receptor-type protein tyrosine phosphatase CD148 (HPTP eta/DEP-1) in Fc gamma receptor IIa signal transduction of human neutrophils. *Eur J Immunol* 27:3532-5.
86. Hynes, R. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-87.
87. Inagaki, K., T. Noguchi, T. Matozaki, T. Horikawa, K. Fukunaga, M. Tsuda, M. Ichihashi, and M. Kasuga. 2000. Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant. *Oncogene* 19:75-84.
88. Irusta, P. M., Y. Luo, O. Bakht, C. C. Lai, S. O. Smith, and D. DiMaio. 2002. Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Biol Chem* 277:38627-34.
89. Iuliano, R., F. Trapasso, I. Sama, I. Le Pera, M. L. Martelli, F. Lembo, M. Santoro, G. Viglietto, L. Chiariotti, and A. Fusco. 2001. Rat protein tyrosine phosphatase eta physically interacts with the PDZ domains of syntenin. *FEBS Lett* 500:41-4.
90. Jallal, B., K. Mossie, G. Vasiloudis, P. Knyazev, J. Zachwieja, F. Clairvoyant, J. Schilling, and A. Ullrich. 1997. The receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1 is constitutively associated with a 64-kDa protein serine/threonine kinase. *J Biol Chem* 272:12158-63.
91. Jazayeri, A., J. McGee, T. Shimamura, S. B. Cross, and B. E. Bejcek. 2000. SHP-2 can suppress transformation induced by platelet-derived growth factor. *Exp Cell Res* 254:197-203.
92. Jequier, E. 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 967:379-88.
93. Ji, J., L. Si, W. Fang, and W. Ling. 2001. Interferon-gamma inhibits in situ expression of PDGF-beta mRNA by smooth muscle cells in injured rabbit arteries after transluminal balloon angioplasty. *Chin Med J (Engl)* 114:139-42.
94. Jiang, G., J. den Hertog, J. Su, J. Noel, J. Sap, and T. Hunter. 1999. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha. *Nature* 401:606-10.
95. Joazeiro, C. A., S. S. Wing, H. Huang, J. D. Levenson, T. Hunter, and Y. C. Liu. 1999. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286:309-12.

96. Johnson, D., M. Agochiya, K. Samejima, W. Earnshaw, M. Frame, and J. Wyke. 2000. Regulation of both apoptosis and cell survival by the v-Src oncoprotein. *Cell Death Differ* 7:685-96.
97. Kamata, H., Y. Shibukawa, S. I. Oka, and H. Hirata. 2000. Epidermal growth factor receptor is modulated by redox through multiple mechanisms. Effects of reductants and H₂O₂. *Eur J Biochem* 267:1933-44.
98. Kaplan, R., B. Morse, K. Huebner, C. Croce, R. Howk, M. Ravera, G. Ricca, M. Jaye, and J. Schlessinger. 1990. Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7000-4.
99. Kaszubska, W., H. Falls, V. Schaefer, D. Haasch, L. Frost, P. Hessler, P. Kroeger, D. White, M. Jirousek, and J. Trevillyan. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol* 195:109.
100. Keane, M. M., G. A. Lowrey, S. A. Ettenberg, M. A. Dayton, and S. Lipkowitz. 1996. The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 56:4236-43.
101. Keilhack, H., U. Hellman, J. van Hengel, F. van Roy, J. Godovac-Zimmermann, and F. D. Bohmer. 2000. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin. *J Biol Chem* 275:26376-84.
102. Kingsley, K., W. L. Rust, J. L. Huff, R. C. Smith, and G. E. Plopper. 2002. PDGF-BB enhances expression of, and reduces adhesion to, laminin-5 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294:1017-22.
103. Klemke, R. L., S. Cai, A. L. Giannini, P. J. Gallagher, P. de Lanerolle, and D. A. Cheresh. 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137:481-92.
104. Klinghoffer, R. A., C. Sachsenmaier, J. A. Cooper, and P. Soriano. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *Embo J* 18:2459-71.
105. Kmiecik, T. E., P. J. Johnson, and D. Shalloway. 1988. Regulation by the autophosphorylation site in overexpressed pp60c-src. *Mol Cell Biol* 8:4541-6.
106. Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, and P. Herrlich. 1996. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J* 15:5314-25.
107. Koera, K., K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, A. Aiba, and M. Katsuki. 1997. K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15:1151-9.
108. Kovalenko, M., K. Denner, J. Sandstrom, C. Persson, S. Gross, E. Jandt, R. Vilella, F. Bohmer, and A. Ostman. 2000. Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem* 275:16219-26.
109. Koyama, N., C. E. Hart, and A. W. Clowes. 1994. Different functions of the platelet-derived growth factor-alpha and -beta receptors for the migration and proliferation of cultured baboon smooth muscle cells. *Circ Res* 75:682-91.

110. Krueger, N. X., M. Streuli, and H. Saito. 1990. Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *Embo J* 9:3241-52.
111. Kusaka, T., H. Fukui, Y. Sano, Y. Ueda, T. Chiba, and T. Fujimori. 2000. Analysis of K-ras codon 12 mutations and p53 overexpression in colorectal nodule-aggregating tumors. *J Gastroenterol Hepatol* 15:1151-7.
112. Lammers, R., B. Bossenmaier, D. E. Cool, N. K. Tonks, J. Schlessinger, E. H. Fischer, and A. Ullrich. 1993. Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem* 268:22456-62.
113. Lammers, R., M. M. Lerch, and A. Ullrich. 2000. The carboxyl-terminal tyrosine residue of protein-tyrosine phosphatase alpha mediates association with focal adhesion plaques. *J Biol Chem* 275:3391-6.
114. LaRochelle, W. J., M. Jeffers, W. F. McDonald, R. A. Chillakuru, N. A. Giese, N. A. Lokker, C. Sullivan, F. L. Boldog, M. Yang, C. Vernet, C. E. Burgess, E. Fernandes, L. L. Deegler, B. Rittman, J. Shimkets, R. A. Shimkets, J. M. Rothberg, and H. S. Lichenstein. 2001. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 3:517-21.
115. Lazarus, A. H., K. Kawauchi, M. J. Rapoport, and T. L. Delovitch. 1993. Antigen-induced B lymphocyte activation involves the p21ras and ras.GAP signaling pathway. *J Exp Med* 178:1765-9.
116. Leveen, P., M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, and C. Betsholtz. 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8:1875-87.
117. Li, B. Q., D. Kaplan, H. F. Kung, and T. Kamata. 1992. Nerve growth factor stimulation of the Ras-guanine nucleotide exchange factor and GAP activities. *Science* 256:1456-9.
118. Li, C., and J. M. Friedman. 1999. Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9677-82.
119. Li, L., and J. E. Dixon. 2000. Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol* 12:75-84.
120. Li, X., A. Ponten, K. Aase, L. Karlsson, A. Abramsson, M. Uutela, G. Backstrom, M. Hellstrom, H. Bostrom, H. Li, P. Soriano, C. Betsholtz, C. H. Heldin, K. Alitalo, A. Ostman, and U. Eriksson. 2000. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2:302-9.
121. Lim, K. L., D. S. Lai, M. B. Kalousek, Y. Wang, and C. J. Pallen. 1997. Kinetic analysis of two closely related receptor-like protein-tyrosine-phosphatases, PTP alpha and PTP epsilon. *Eur J Biochem* 245:693-700.
122. Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz. 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277:242-5.
123. Lindahl, P., L. Karlsson, M. Hellstrom, S. Gebre-Medhin, K. Willetts, J. K. Heath, and C. Betsholtz. 1997. Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development* 124:3943-53.

124. Lindmark, G., C. Sundberg, B. Glimelius, L. Pahlman, K. Rubin, and B. Gerdin. 1993. Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer. *Lab Invest* 69:682-9.
125. Liu, F., and J. Chernoff. 1997. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem J* 327 (Pt 1):139-45.
126. Liu, F., M. A. Sells, and J. Chernoff. 1998. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. *Curr Biol* 8:173-6.
127. Liu, S., D. A. Calderwood, and M. H. Ginsberg. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 20):3563-71.
128. Lokker, N. A., J. P. O'Hare, A. Barsoumian, J. E. Tomlinson, V. Ramakrishnan, L. J. Fretto, and N. A. Giese. 1997. Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 272:33037-44.
129. Lokker, N. A., C. M. Sullivan, S. J. Hollenbach, M. A. Israel, and N. A. Giese. 2002. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* 62:3729-35.
130. Lu, B., D. Ennis, R. Lai, E. Bogdanovic, R. Nikolov, L. Salamon, C. Fantus, H. Le-Tien, and I. G. Fantus. 2001. Enhanced sensitivity of insulin-resistant adipocytes to vanadate is associated with oxidative stress and decreased reduction of vanadate (+5) to vanadyl (+4). *J Biol Chem* 276:35589-98.
131. Lu, J., Q. Li, G. Donadel, A. L. Notkins, and M. S. Lan. 1998. Profile and differential expression of protein tyrosine phosphatases in mouse pancreatic islet tumor cell lines. *Pancreas* 16:515-20.
132. Lunardi, C., C. Bason, M. Leandri, R. Navone, M. Lestani, E. Millo, U. Benatti, M. Cilli, R. Beri, R. Corrocher, and A. Puccetti. 2002. Autoantibodies to inner ear and endothelial antigens in Cogan's syndrome. *Lancet* 360:915-21.
133. Maeda, Y., M. Solanky, J. Menonna, J. Chapin, W. Li, and P. Dowling. 2001. Platelet-derived growth factor-alpha receptor-positive oligodendroglia are frequent in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 49:776-85.
134. Magee, A. I., C. M. Newman, T. Giannakouros, J. F. Hancock, E. Fawell, and J. Armstrong. 1992. Lipid modifications and function of the ras superfamily of proteins. *Biochem Soc Trans* 20:497-9.
135. Mahadev, K., A. Zilbering, L. Zhu, and B. J. Goldstein. 2001. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* 276:21938-42.
136. Marra, F., A. Gentilini, M. Pinzani, G. G. Choudhury, M. Parola, H. Herbst, M. U. Dianzani, G. Laffi, H. E. Abboud, and P. Gentilini. 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 112:1297-306.

137. Mary, F., C. Moon, T. Venaille, M. L. Thomas, D. Mary, and A. Bernard. 1999. Modulation of TCR signaling by beta1 integrins: role of the tyrosine phosphatase SHP-1. *Eur J Immunol* 29:3887-97.
138. Matsuno, K., T. Nakajima, M. Ichimura, N. A. Giese, J. C. Yu, N. A. Lokker, J. Ushiki, S. Ide, S. Oda, and Y. Nomoto. 2002. Potent and selective inhibitors of PDGF receptor phosphorylation. 2. Synthesis, structure activity relationship, improvement of aqueous solubility, and biological effects of 4-[4-(N-substituted (thio)carbamoyl)-1-piperazinyl]-6,7-dimethoxyquinazoline derivatives. *J Med Chem* 45:4513-23.
139. Matthews, R. J., E. D. Cahir, and M. L. Thomas. 1990. Identification of an additional member of the protein-tyrosine-phosphatase family: evidence for alternative splicing in the tyrosine phosphatase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4444-8.
140. Meng, T. C., T. Fukada, and N. K. Tonks. 2002. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9:387-99.
141. Milarski, K. L., G. Zhu, C. G. Pearl, D. J. McNamara, E. M. Dobrusin, D. MacLean, A. Thieme-Seffler, Z. Y. Zhang, T. Sawyer, S. J. Decker, and et al. 1993. Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 268:23634-9.
142. Miyake, S., M. L. Lupher, Jr., B. Druker, and H. Band. 1998. The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7927-32.
143. Moller, N. P., K. B. Moller, R. Lammers, A. Kharitononkov, E. Hoppe, F. C. Wiberg, I. Sures, and A. Ullrich. 1995. Selective down-regulation of the insulin receptor signal by protein-tyrosine phosphatases alpha and epsilon. *J Biol Chem* 270:23126-31.
144. Moran, M. F., P. Polakis, F. McCormick, T. Pawson, and C. Ellis. 1991. Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol* 11:1804-12.
145. Nanney, L. B., M. K. Davidson, R. E. Gates, M. Kano, and L. E. King, Jr. 1997. Altered distribution and expression of protein tyrosine phosphatases in normal human skin as compared to squamous cell carcinomas. *J Cutan Pathol* 24:521-32.
146. Neel, B. G., and N. K. Tonks. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9:193-204.
147. Ohagi, S., M. Nishi, and D. F. Steiner. 1990. Sequence of a cDNA encoding human LRP (leukocyte common antigen-related peptide). *Nucleic Acids Res* 18:7159.
148. Osborne, J. M., N. den Elzen, A. M. Lichanska, E. O. Costelloe, T. Yamada, A. I. Cassady, and D. A. Hume. 1998. Murine DEP-1, a receptor protein tyrosine phosphatase, is expressed in macrophages and is regulated by CSF-1 and LPS. *J Leukoc Biol* 64:692-701.
149. Ostman, A., and F. D. Bohmer. 2001. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* 11:258-66.

150. Ostman, A., Q. Yang, and N. K. Tonks. 1994. Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9680-4.
151. Pallen, C. J. 1993. The receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha: a role in cell proliferation and oncogenesis. *Semin Cell Biol* 4:403-8.
152. Palou, E., M. A. de la Fuente-Garcia, J. M. Nicolas, C. Vilardell, J. Vives, and A. Gaya. 1997. CD148, a membrane protein tyrosine phosphatase, is able to induce tyrosine phosphorylation on human lymphocytes. *Immunol Lett* 57:101-3.
153. Pathre, P., C. Arregui, T. Wampler, I. Kue, T. C. Leung, J. Lilien, and J. Balsamo. 2001. PTP1B regulates neurite extension mediated by cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. *J Neurosci Res* 63:143-50.
154. Persson, C., U. Engstrom, S. L. Mowbray, and A. Ostman. 2002. Primary sequence determinants responsible for site-selective dephosphorylation of the PDGF beta-receptor by the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *FEBS Lett* 517:27-31.
155. Pietras, K., A. Ostman, M. Sjoquist, E. Buchdunger, R. K. Reed, C. H. Heldin, and K. Rubin. 2001. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 61:2929-34.
156. Pulido, R., C. Serra-Pages, M. Tang, and M. Streuli. 1995. The LAR/PTP delta/PTP sigma subfamily of transmembrane protein-tyrosine-phosphatases: multiple human LAR, PTP delta, and PTP sigma isoforms are expressed in a tissue-specific manner and associate with the LAR-interacting protein LIP.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11686-90.
157. Ranieri, E., L. Gesualdo, G. Grandaliano, E. Maiorano, and F. P. Schena. 2001. The role of alpha-smooth muscle actin and platelet-derived growth factor-beta receptor in the progression of renal damage in human IgA nephropathy. *J Nephrol* 14:253-62.
158. Raugei, G., G. Ramponi, and P. Chiarugi. 2002. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell Mol Life Sci* 59:941-9.
159. Rhee, J., J. Lilien, and J. Balsamo. 2001. Essential tyrosine residues for interaction of the non-receptor protein-tyrosine phosphatase PTP1B with N-cadherin. *J Biol Chem* 276:6640-4.
160. Riley, D., N. O. Carragher, M. C. Frame, and J. A. Wyke. 2001. The mechanism of cell cycle regulation by v-Src. *Oncogene* 20:5941-50.
161. Roach, T. I., S. E. Slater, L. S. White, X. Zhang, P. W. Majerus, E. J. Brown, and M. L. Thomas. 1998. The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates integrin-mediated adhesion of macrophages. *Curr Biol* 8:1035-8.
162. Roche, S., M. Koegl, M. V. Barone, M. F. Roussel, and S. A. Courtneidge. 1995. DNA synthesis induced by some but not all growth factors requires Src family protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 15:1102-9.
163. Rodt, S. A., K. Ahlen, A. Berg, K. Rubin, and R. K. Reed. 1996. A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis. *J Physiol* 495 (Pt 1):193-200.

164. Ronnstrand, L., and C. H. Heldin. 2001. Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *Int J Cancer* 91:757-62.
165. Ronnstrand, L., A. Siegbahn, C. Rorsman, M. Johnell, K. Hansen, and C. H. Heldin. 1999. Overactivation of phospholipase C-gamma1 renders platelet-derived growth factor beta-receptor-expressing cells independent of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway for chemotaxis. *J Biol Chem* 274:22089-94.
166. Rosenkranz, S., and A. Kazlauskas. 1999. Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* 16:201-16.
167. Rossetti, G., M. Collinge, J. R. Bender, R. Molteni, and R. Pardi. 2002. Integrin-dependent regulation of gene expression in leukocytes. *Immunol Rev* 186:189-207.
168. Ruivenkamp, C. A., T. van Wezel, C. Zanon, A. P. Stassen, C. Vlcek, T. Csikos, A. M. Klous, N. Tripodis, A. Perrakis, L. Boerrigter, P. C. Groot, J. Lindeman, W. J. Mooi, G. A. Meijjer, G. Scholten, H. Dauwerse, V. Paces, N. van Zandwijk, G. J. van Ommen, and P. Demant. 2002. Ptptrj is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Scc1 and is frequently deleted in human cancers. *Nat Genet* 31:295-300.
169. Sachinidis, A., R. Locher, J. Hoppe, and W. Vetter. 1990. The platelet-derived growth factor isomers, PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB, induce contraction of vascular smooth muscle cells by different intracellular mechanisms. *FEBS Lett* 275:95-8.
170. Sachinidis, A., R. Locher, W. Vetter, D. Tatje, and J. Hoppe. 1990. Different effects of platelet-derived growth factor isoforms on rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 265:10238-43.
171. Sap, J., P. D'Eustachio, D. Givol, and J. Schlessinger. 1990. Cloning and expression of a widely expressed receptor tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6112-6.
172. Schaapveld, R., B. Wieringa, and W. Hendriks. 1997. Receptor-like protein tyrosine phosphatases: alike and yet so different. *Mol Biol Rep* 24:247-62.
173. Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-25.
174. Schraven, B. 2000. Cd148. *J Biol Regul Homeost Agents* 14:220-2.
175. Schwartz, M. A. 2001. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 11:466-70.
176. Schwartz, M. A., and M. H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 4:E65-8.
177. Seely, B. L., P. A. Staubs, D. R. Reichart, P. Berhanu, K. L. Milarski, A. R. Saltiel, J. Kusari, and J. M. Olefsky. 1996. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes* 45:1379-85.
178. Sefton, B. M., T. Hunter, K. Beemon, and W. Eckhart. 1980. Evidence that the phosphorylation of tyrosine is essential for cellular transformation by Rous sarcoma virus. *Cell* 20:807-16.

179. Serra-Pages, C., N. L. Kedersha, L. Fazikas, Q. Medley, A. Debant, and M. Streuli. 1995. The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *Embo J* 14:2827-38.
180. Seymour, L., D. Dajee, and W. R. Bezwoda. 1993. Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 26:247-52.
181. Shimizu, H., M. Shiota, N. Yamada, K. Miyazaki, N. Ishida, S. Kim, and H. Miyazaki. 2001. Low M(r) protein tyrosine phosphatase inhibits growth and migration of vascular smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 289:602-7.
182. Siegbahn, A., A. Hammacher, B. Westermarck, and C. H. Heldin. 1990. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* 85:916-20.
183. Siegbahn, A., M. Johnell, C. Rorsman, M. Ezban, C. H. Heldin, and L. Ronnstrand. 2000. Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis. *Blood* 96:3452-8.
184. Sorby, M., J. Sandstrom, and A. Ostman. 2001. An extracellular ligand increases the specific activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *Oncogene* 20:5219-24.
185. Soriano, P. 1994. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 8:1888-96.
186. Su, J., A. Batzer, and J. Sap. 1994. Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-alpha is tyrosine-phosphorylated and associated with the adaptor protein Grb2. *J Biol Chem* 269:18731-4.
187. Su, J., M. Muranjan, and J. Sap. 1999. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts. *Curr Biol* 9:505-11.
188. Sundberg, C., M. Ljungstrom, G. Lindmark, B. Gerdin, and K. Rubin. 1993. Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 143:1377-88.
189. Takahashi, T., K. Takahashi, R. Mernaugh, V. Drozdoff, C. Sipe, H. Schoecklmann, B. Robert, D. R. Abrahamson, and T. O. Daniel. 1999. Endothelial localization of receptor tyrosine phosphatase, ECRT/DEP-1, in developing and mature renal vasculature. *J Am Soc Nephrol* 10:2135-45.
190. Takakura, K., J. S. Beckman, L. A. MacMillan-Crow, and J. P. Crow. 1999. Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 369:197-207.
191. Tallquist, M. D., R. A. Klinghoffer, R. Heuchel, P. F. Muetting-Nelsen, P. D. Corrin, C. H. Heldin, R. J. Johnson, and P. Soriano. 2000. Retention of PDGFR-beta function in mice in the absence of phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase Cgamma signaling pathways. *Genes Dev* 14:3179-90.

192. Tang, S., H. Le-Tien, B. J. Goldstein, P. Shin, R. Lai, and I. G. Fantus. 2001. Decreased in situ insulin receptor dephosphorylation in hyperglycemia-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes* 50:83-90.
193. Tangye, S. G., Y. J. Liu, G. Aversa, J. H. Phillips, and J. E. de Vries. 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 188:1691-703.
194. Tangye, S. G., J. H. Phillips, L. L. Lanier, J. E. de Vries, and G. Aversa. 1998. CD148: a receptor-type protein tyrosine phosphatase involved in the regulation of human T cell activation. *J Immunol* 161:3249-55.
195. Tangye, S. G., J. Wu, G. Aversa, J. E. de Vries, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1998. Negative regulation of human T cell activation by the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD148. *J Immunol* 161:3803-7.
196. Tao, J., C. C. Malbon, and H. Y. Wang. 2001. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo. *J Biol Chem* 276:29520-5.
197. Tatosyan, A. G., and O. A. Mizenina. 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 65:49-58.
198. Thomas, S. M., and J. S. Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:513-609.
199. Tobin, J. F., and S. Tam. 2002. Recent advances in the development of small molecule inhibitors of PTP1B for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5:500-12.
200. Tracy, S., P. van der Geer, and T. Hunter. 1995. The receptor-like protein-tyrosine phosphatase, RPTP alpha, is phosphorylated by protein kinase C on two serines close to the inner face of the plasma membrane. *J Biol Chem* 270:10587-94.
201. Trapasso, F., R. Iuliano, A. Boccia, A. Stella, R. Visconti, P. Bruni, G. Baldassarre, M. Santoro, G. Viglietto, and A. Fusco. 2000. Rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27(Kip1). *Mol Cell Biol* 20:9236-46.
202. Venable, C. L., E. U. Frevert, Y. B. Kim, B. M. Fischer, S. Kamatkar, B. G. Neel, and B. B. Kahn. 2000. Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *J Biol Chem* 275:18318-26.
203. Walsh, A. B., and D. Bar-Sagi. 2001. Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem* 276:15609-15.
204. Wang, Y., and C. J. Pallen. 1991. The receptor-like protein tyrosine phosphatase HPTP alpha has two active catalytic domains with distinct substrate specificities. *Embo J* 10:3231-7.
205. Warabi, M., T. Nemoto, K. Ohashi, M. Kitagawa, and K. Hirokawa. 2000. Expression of protein tyrosine phosphatases and its significance in esophageal cancer. *Exp Mol Pathol* 68:187-95.

206. Weiss, A., and J. Schlessinger. 1998. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 94:277-80.
207. Wells, A., J. B. Welsh, C. S. Lazar, H. S. Wiley, G. N. Gill, and M. G. Rosenfeld. 1990. Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science* 247:962-4.
208. Weng, L. P., X. Wang, and Q. Yu. 1999. Transmembrane tyrosine phosphatase LAR induces apoptosis by dephosphorylating and destabilizing p130Cas. *Genes Cells* 4:185-96.
209. Wennstrom, S., and J. Downward. 1999. Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 19:4279-88.
210. Westermarck, B., L. Claesson-Welsh, and C. H. Heldin. 1989. Structural and functional aspects of the receptors for platelet-derived growth factor. *Prog Growth Factor Res* 1:253-66.
211. Woodside, D. G., S. Liu, and M. H. Ginsberg. 2001. Integrin activation. *Thromb Haemost* 86:316-23.
212. Wu, L., A. Buist, J. den Hertog, and Z. Y. Zhang. 1997. Comparative kinetic analysis and substrate specificity of the tandem catalytic domains of the receptor-like protein-tyrosine phosphatase alpha. *J Biol Chem* 272:6994-7002.
213. Yu, J., T. F. Deuel, and H. R. Kim. 2000. Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor-alpha activates c-Jun NH2-terminal kinase-1 and antagonizes PDGF receptor-beta -induced phenotypic transformation. *J Biol Chem* 275:19076-82.
214. Yu, J. C., D. Mahadevan, W. J. LaRochelle, J. H. Pierce, and M. A. Heidaran. 1994. Structural coincidence of alpha PDGFR epitopes binding to platelet-derived growth factor-AA and a potent neutralizing monoclonal antibody. *J Biol Chem* 269:10668-74.
215. Zabolotny, J. M., K. K. Bence-Hanulec, A. Stricker-Krongrad, F. Haj, Y. Wang, Y. Minokoshi, Y. B. Kim, J. K. Elmquist, L. A. Tartaglia, B. B. Kahn, and B. G. Neel. 2002. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2:489-95.
216. Zeng, L., L. D'Alessandri, M. B. Kalousek, L. Vaughan, and C. J. Pallen. 1999. Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha) and contactin form a novel neuronal receptor complex linked to the intracellular tyrosine kinase fyn. *J Cell Biol* 147:707-14.
217. Zhai, Y. F., H. Beittenmiller, B. Wang, M. N. Gould, C. Oakley, W. J. Esselman, and C. W. Welsch. 1993. Increased expression of specific protein tyrosine phosphatases in human breast epithelial cells neoplastically transformed by the neu oncogene. *Cancer Res* 53:2272-8.
218. Zhang, L., M. L. Martelli, C. Battaglia, F. Trapasso, D. Tramontano, G. Viglietto, A. Porcellini, M. Santoro, and A. Fusco. 1997. Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase. *Exp Cell Res* 235:62-70.
219. Zhang, Z. Y. 1998. Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33:1-52.

- 220. Zheng, X. M., and C. J. Pallen. 1994. Expression of receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha in rat embryo fibroblasts activates mitogen-activated protein kinase and c-Jun. *J Biol Chem* 269:23302-9.
- 221. Zheng, X. M., R. J. Resnick, and D. Shalloway. 2002. Mitotic activation of protein-tyrosine phosphatase alpha and regulation of its Src-mediated transforming activity by its sites of protein kinase C phosphorylation. *J Biol Chem* 277:21922-9.
- 222. Zheng, X. M., R. J. Resnick, and D. Shalloway. 2000. A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *Embo J* 19:964-78.
- 223. Zheng, X. M., and D. Shalloway. 2001. Two mechanisms activate PTPalpha during mitosis. *Embo J* 20:6037-49.
- 224. Zheng, X. M., Y. Wang, and C. J. Pallen. 1992. Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 359:336-9.
- 225. Zinker, B. A., C. M. Rondinone, J. M. Trevillyan, R. J. Gum, J. E. Clampit, J. F. Waring, N. Xie, D. Wilcox, P. Jacobson, L. Frost, P. E. Kroeger, R. M. Reilly, S. Koterski, T. J. Opgenorth, R. G. Ulrich, S. Crosby, M. Butler, S. F. Murray, R. A. McKay, S. Bhanot, B. P. Monia, and M. R. Jirousek. 2002. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11357-62.
- 226. Zondag, G. C., and W. H. Moolenaar. 1997. Receptor protein tyrosine phosphatases: involvement in cell-cell interaction and signaling. *Biochimie* 79:477-83.
- 227. Zwerner, J. P., and W. A. May. 2002. Dominant negative PDGF-C inhibits growth of Ewing family tumor cell lines. *Oncogene* 21:3847-54.
- 228. Zwerner, J. P., and W. A. May. 2001. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene* 20:626-33.

5.4. Danksagung

An dieser Stelle nun möchte ich bei einigen Menschen danken, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. An erster Stelle danke ich Dr. Frank Böhmer, der nicht nur das Thema bereit stellte, sondern für drei weitere Jahre mit Höhen und Tiefen die Rolle als mein Betreuer übernahm. Er stand mir auch immer mit seinem Rat und seiner Erfahrung zur Seite, wenn es um die Planung, Durchführung und die Interpretation der Experimente ging und der stets einen optimistischen Blick auf die Ergebnisse hatte.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Wetzker bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat die vorliegende Arbeit in der „Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie“ anzufertigen und natürlich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Molekulare Zellbiologie" und besonders bei Andrea Uecker und Dorith Schmidt. Ohne Eure Hilfsbereitschaft und die guten Arbeitsbedingungen wäre alles sicher viel schwerer zu bewältigen gewesen.

Während meiner Arbeit hatte ich erneut die Möglichkeit für einen Forschungsaufenthalt am Ludwig Institute for Cancer Research in Uppsala, Schweden. Auf diesem Wege will ich mich noch einmal bei Dr. Arne Östman und seiner Arbeitsgruppe für die Gelegenheit bei ihnen zu arbeiten und für die angenehme Gestaltung meiner Besuche bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Schwester, deren stete Unterstützung nicht nur moralischen Beistand für mich bedeutete und ohne die ich sicher nicht so weit gekommen wäre.

Herzlichen Dank!

5.5. Lebenslauf

Name: Jandt

Vorname: Enrico

Geburtsdatum: 31.10.1974

Geburtsort: Ilmenau

Familienstand: ledig

01.09.1981 bis Juli 1990 Besuch der POS "Maxim Gorki" in
Stützerbach

September 1990 bis Juli 1994 Besuch des Gymnasiums "Am Ehrenberg" in
Ilmenau

Juli 1994 Abschluss des Gymnasiums mit dem Abitur

Oktober 1994 Beginn des Studiums der Biochemie/
Molekularbiologie an der Biologisch-/
Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena

März 1999 Forschungsaufenthalt am Ludwig Institute for
Cancer Research in Uppsala, Schweden

Dezember 1998 bis September 1999 .. Anfertigung der Diplomarbeit in der
Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ am
Klinikum der FSU Jena

September 1999 Exmatrikulation nach Beendigung des
Studiums, Abschluss mit dem Diplom als
Diplom-Biochemiker

seit Oktober 1999 Doktorand in der Arbeitsgruppe „Molekulare
Zellbiologie“ am Klinikum der FSU Jena

Januar und Februar 2001 Forschungsaufenthalt am Ludwig Institute for
Cancer Research in Uppsala, Schweden

5.6. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 05.12.2002

Enrico Jandt

5.7. Erklärung zur Bewerbung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotions-Ordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 05.12.2002

Enrico Jandt